

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. M. Gassmann)

**Zur Beeinflussung des Verzehrsverhaltens durch Exendin-4, Leptin und
Ghrelin**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Simone Jacqueline Gilg
Tierärztin
von Kriens, LU und Urdorf, ZH

genehmigt auf Antrag von
PD Dr. T.A. Lutz, Referent
Prof. Dr. C. Reusch, Korreferentin

Zürich 2003
Zentralstelle der Studentenschaft

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	2
3. EINLEITUNG	3
4. LITERATUR	5
4.1. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)	5
4.1.1. Geschichte	5
4.1.2. Struktur und Vorkommen	5
4.1.3. Wirkungen von GLP-1	6
4.1.3.1 Wirkungen auf das endokrine Pankreas	6
4.1.3.2 Wirkungen auf den Gastrointestinaltrakt und die Appetitregulation	7
4.1.3.3 Wirkungsorte	8
4.1.3.4 Exendin-4: GLP-1-Agonist	10
4.2. Ghrelin	11
4.2.1. Geschichte	11
4.2.2. Struktur und Vorkommen	11
4.2.3. Wirkungen von Ghrelin	12
4.2.3.1 Einfluss von Ghrelin auf die Wachstumshormonausschüttung	12
4.2.3.2 Einfluss von Ghrelin auf die Appetitregulation	13
4.2.4. Wirkungsorte von Ghrelin	14
4.3. Leptin	15
5. TIERE, MATERIAL UND METHODEN	17
5.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	17
5.2. Käfigmodelle und Messmethoden	21
5.2.1. Einzelhaltung in Drahtgitterkäfigen	21
5.2.1.1 Messung der kumulativen Futteraufnahme	21
5.2.2. Einzelhaltung in Makrolonkäfigen mit automatischer Erfassung des Verzehrsmusters	21
5.3. Gruppeneinteilung	22
5.4. Intraperitoneale Injektion	22

5.5.	Verwendete Substanzen	23
5.6.	Area postrema-Läsionen	23
5.7.	Subdiaphragmatische Vagotomie (VAG) und Verifikation	24
5.8.	Nachweis einer Geschmacksaversion	25
5.9.	Statistik	28
6.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	29
6.1.	Untersuchungen zur Vermittlung des anorektischen Effekts von Exendin-4	29
6.1.1.	Experiment 1: Einfluss von Exendin-4 (20µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 24h gefasteten VAG- und SHAM-Ratten	31
6.1.2.	Experiment 2: Einfluss von Exendin-4 (2µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 6h gefasteten VAG- und SHAM-Ratten	33
6.1.3.	Experiment 3: Einfluss von Exendin-4 (10µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten H ₁ Rko- und Wildtyp-Mäusen	35
6.1.4.	Experiment 4: Einfluss von Exendin-4 (20µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten H ₁ Rko- und Wildtyp-Mäusen	36
6.1.5.	Experiment 5: Einfluss von Exendin-4 (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten H ₁ Rko- und Wildtyp-Mäusen	38
6.1.6.	Experiment 6: Einfluss von Amylin (5µg/kg s.c.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten AP-X- und SHAM-Ratten	39
6.1.7.	Experiment 7: Einfluss von Exendin-4 (0.5µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 24h gefasteten AP-X- und SHAM- Ratten	41
6.1.8.	Experiment 8: Einfluss von Exendin-4 (2µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von 24h gefasteten AP-X- und SHAM- Ratten	43
6.1.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente 1-8	44
6.2.	Experiment 9: Untersuchung zur Auslösung einer Geschmacksaversion durch Exendin-4	46
6.3.	Untersuchungen zum Einfluss von Ghrelin auf das Verzehrsverhalten von Ratten	49
6.3.1.	Experiment 10: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, jungen adulten Ratten	49
6.3.2.	Experiment 11: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten, jungen adulten Ratten	51
6.3.3.	Experiment 12: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, jungen adulten Ratten	52

6.3.4.	Experiment 13: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, jungen adulten Ratten	53
6.3.5.	Experiment 14: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, adulten Ratten	55
6.3.6.	Experiment 15: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, adulten AP-X- und SHAM-Ratten	57
6.3.7.	Experiment 16: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, adulten AP-X- und SHAM-Ratten	59
6.3.8.	Experiment 17: Einfluss einer wiederholten Ghrelinapplikation (15µg/kg/Tag; über 10 Tage) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten, adulten AP-X- und SHAM-Ratten	60
6.3.9.	Zusammenfassung der Experimente 10-17	64
6.4.	Untersuchungen zum Einfluss von Leptin auf das Verzehrsverhalten von Ratten	65
6.4.1.	Experiment 18: Einfluss von Leptin (600µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten AP-X- und SHAM-Ratten	65
6.4.2.	Experiment 19: Einfluss von Leptin (1.2mg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten AP-X- und SHAM-Ratten	66
6.4.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse 18 und 19	67
7.	DISKUSSION	68
7.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	68
7.2.	Bedeutung von Area postrema, Nervus vagus und histaminergem System für die Wirkungsvermittlung von Exendin-4	68
7.3.	Ist der anorektische Effekt von Exendin-4 auf eine Geschmacksaversion zurückzuführen?	70
7.4.	Altersabhängige Wirkung von Ghrelin auf das Verzehrsverhalten von Ratten und die Beteiligung der AP	72
8.	LITERATURVERZEICHNIS	77
9.	DANKSAGUNG	96

Abkürzungen

ACTH	adrenokortikotropes Hormon
AGRP	agouti-related protein
AP	Area postrema
AP-X	Area postrema Läsion
Arc (L,M)	Nucleus arcuatus (ventrolateral, ventromedial)
BBS	Bombesin
CCK	Cholezystokinin
ceA	zentraler Nucleus der Amygdala
CTA	conditioned taste aversion
DP	Dunkelphase
GHRH	growth hormone-releasing hormone
GHS(-R)	growth hormone secretagogue(-receptor)
GLP-1,2	glucagon-like peptide 1,2
HK-Diät	Hochkohlenhydrat-Diät
HP	Hellphase
H ₁ Rko	Histamin-H ₁ -Rezeptor-knockout
ICV	intracerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
KGW	Körpergewicht
MF-Diät	Mittelfett-Diät
MSG	Monosodium Glutamat
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
PBN	Nucleus parabrachialis
PVN	Nucleus paraventricularis
SHAM	Schein-
VAG	subdiaphragmatische Vagotomie
wt	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Wirkungsvermittlung der anorektisch wirkenden Hormone GLP-1 (bzw. dessen längerwirksamen Agonisten Exendin-4) und Leptin, sowie des erst kürzlich entdeckten orexigen wirkenden Hormons Ghrelin. Dabei bestand eines der Ziele darin herauszufinden, ob Exendin-4 seine Wirkung durch die gleichen ZNS-Mechanismen vermittelt wie Amylin, und ob es wie GLP-1 eine erlernte Geschmacksaversion auslösen kann. Bezüglich Ghrelin sollte abgeklärt werden, ob sein orexigener Effekt altersabhängig ist, und ob die AP in bedeutender Weise in die Wirkungsvermittlung eingreift. Schliesslich interessierte uns, inwiefern eine AP-Läsion die Wirkung von peripher appliziertem Leptin beeinflusst.

Unsere Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen bzw. Schlussfolgerungen:

- Exendin-4 bewirkt eine Verzehrsreduktion, die direkt durch zentralnervöse Mechanismen vermittelt wird. Für die Wirkungsvermittlung sind jedoch die AP und das histaminerge System von untergeordneter Bedeutung, d.h. der Effekt von GLP-1 respektive Exendin-4 ist wohl nicht primär durch eine Stimulation der Amylinsekretion bedingt.
- Exendin-4 löst eine Geschmacksaversion aus, die mit derjenigen von LiCl vergleichbar ist. Exendin-4 kann deshalb nicht als klassisches Sättigungspeptid bezeichnet werden.
- Die verzehrssteigernde Wirkung von Ghrelin scheint altersabhängig zu sein, d.h. in unseren Versuchen war dieser Effekt am stärksten bei jungen adulten Ratten im intensiven Wachstum zu beobachten. Die AP scheint für die Wirkungsvermittlung keine entscheidende Rolle zu spielen.
- Eine AP-Läsion hob den anorektischen Effekt von Leptin nicht auf, obwohl die AP-X-Tiere eine geringgradig schwächere Verzehrsdepression zeigten als die SHAM-Ratten. Die AP scheint demzufolge für die Verzehrsreduktion durch Leptin nicht ausschlaggebend zu sein.

2. Summary

In the present study, we investigated the effects of GLP-1 (resp. its potent agonist exendin-4), leptin and ghrelin on food intake and how these effects are mediated. One aim of this study was to find out, whether the same CNS mechanisms which are responsible for amylin's anorectic effect, are involved in mediating the reduction of food intake caused by exendin-4. We also wanted to clarify if exendin-4 produces a conditioned taste aversion (CTA), as is known for GLP-1. Further, it was of interest, whether the stimulation of food intake by ghrelin is dependent on the age of the rats, and if the AP is involved in mediating this effect. Finally, AP-lesioned rats served to investigate if the anorectic effect of peripheral leptin is mediated by the AP.

Our investigations resulted in the following findings and conclusions:

- Exendin-4 produces a reduction in food intake, which is mediated by the CNS. However, the AP and the histaminergic system don't seem to play an important role in this regard. Other mechanisms than the ones mediating the anorexia caused by amylin therefore appear to be involved in producing the effect of exendin-4 on food intake. The anorectic effect of GLP-1 or Exendin-4, respectively, therefore does not seem to be dependent on a release of pancreatic amylin.
- Exendin-4 produces CTA, similar to the one caused by LiCl. Exendin-4 can therefore not be classified as a pure satiety factor.
- The orexigenic effect of ghrelin appears to depend on the age of the rats. In our experiments, the orexigenic effect of ghrelin was best seen in young adult rats of up to 160g. The AP, however, doesn't seem to be importantly involved in the signaling transmission of ghrelin's orexigenic effect.
- A lesion of the AP did not abolish the anorectic effect of leptin, although the reduction in food intake was not quite as strong in the AP-X-rats as it was in the SHAM-rats. Thus the AP doesn't seem to be of importance in mediating the anorectic effect of leptin.

3. Einleitung

Obesitas und deren Begleiterscheinungen gelten heute in Industrieländern als eine der wichtigsten Ursachen für Krankheit und reduzierte Lebenserwartung. Der Schlüssel zum Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, welche solche Störungen verursachen, liegt in einer intensiven Erforschung der Regulation der Nahrungsaufnahme.

Hunger und Sättigung sind das Resultat einer zentralen Verarbeitung von verschiedenen Signalen aus der Peripherie und dem zentralen Nervensystem (ZNS). Bei der Integration solcher Feedback-Signale spielen die Area postrema/Nucleus tractus solitarii (AP/NTS)-Region und der Hypothalamus eine wichtige Rolle. Diese Zentren vermitteln u.a. die Effekte vieler verzehrssteigernder und verzehrsreduzierender Hormone. Bei den verzehrsreduzierenden Hormonen unterscheidet man die klassischen Sättigungssignale wie Cholezystokinin (CCK) und Bombesin (BBS), aber auch Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) und Amylin, von den lipostatischen Signalen wie Leptin und Insulin. Während Sättigungssignale in Abhängigkeit der Nahrungsaufnahme sezerniert werden und die Futteraufnahme kurzfristig kontrollieren, indem sie zu einer Beendigung der Mahlzeit führen, beeinflussen lipostatische Signale, deren Sekretion vor allem von der Grösse der Fettdepots abhängt, die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht langfristig. Erst kürzlich entdeckt wurde das aus der Magenschleimhaut stammende Hormon Ghrelin. Neben einer Stimulation der Somatotropin-Sekretion wirkt Ghrelin auch verzehrssteigernd. Vor allem nach zentraler Applikation führt Ghrelin zu einer Steigerung der Futteraufnahme, wobei es durch die Aktivierung des hypothalamischen Neuropeptid Y (NPY)-Systems als Gegenspieler von Leptin fungiert. Es wird spekuliert, dass Ghrelin durch die Erzeugung einer positiven Energiebilanz die anabole Wirkung von Somatotropin unterstützt.

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden:

1. Wird der verzehrsreduzierende Effekt des langwirksamen GLP-1-Analogons Exendin-4 durch die gleichen zentralnervösen Mechanismen vermittelt wie derjenige von Amylin?
2. Löst Exendin-4 eine Geschmacksaversion aus?
3. Ist der verzehrssteigernde Effekt von Ghrelin altersabhängig?
4. Hebt eine Läsion der Area postrema die anorektische Wirkung von peripher appliziertem Leptin auf?

4. Literatur

4.1. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)

4.1.1. Geschichte

1964 beobachteten McIntyre et al., dass nach oraler Gabe von Glucose der Insulinspiegel viel stärker anstieg als nach intravenöser Verabreichung. Er vermutete als Ursache eine Freisetzung von intestinalen humoralen Substanzen, die diesen sogenannten inkretinen Effekt auslösten (McIntyre et al., 1964). Bei von diesen Untersuchungen unabhängigen Sequenzanalysen des Präproglucagon-Gens wurden dann zwei glucagonähnliche Sequenzen mit hoher Homologie gefunden und glucagon-like peptide 1 und 2 genannt (Bell et al., 1983a, b). Noch waren aber weder entsprechende Peptidprodukte noch Funktionen bekannt. *Holst et al. (1987)* konnte schliesslich natürliches GLP-1 aus Schweinedünndarm isolieren und einen Teil seiner Aminosäuresequenz bestimmen. Nach Inkubation mit diesem natürlichen GLP-1 konnte er am perfundierten Pankreas eine markante Steigerung der Insulinfreisetzung zeigen und vermutete, dass GLP-1 die Substanz ist, welche für den inkretinen Effekt verantwortlich ist. Die vollständige Aminosäuresequenz des natürlich vorkommenden GLP-1 wurde schliesslich von *Orskov et al. (1989)* bestimmt.

4.1.2. Struktur und Vorkommen

GLP-1 wird von seinem Vorläufer Proglucagon, der auch noch die Sequenz für GLP-2 enthält, abgespalten (Bell et al., 1983a). Die Hauptendprodukte von Proglucagon sind je nach Produktionsort unterschiedlich: Glucagon, Glicentin related pancreatic peptide (GRPP), GLP-1 und GLP-2 im Pankreas, Glicentin, GLP-1 und GLP-2 im Dünndarm (Orskov et al., 1986). Natürlich vorkommendes

GLP-1 entspricht Proglucagon (78-107), besteht aus 30 Aminosäuren (Orskov et al., 1988) und hat ein Molekulargewicht von ca. 3300 (Orskov et al., 1989). GLP-1 wird im Pankreas und im Magen-Darm-Trakt gebildet (Orskov et al., 1986). Daneben wird es auch im ZNS synthetisiert, dort jedoch ausschliesslich im NTS und im dorsalen und ventralen Teil des retikulären Nukleus (Larsen et al., 1997a; Tang-Christensen et al., 1998).

GLP-1 wird im Pankreas an der Peripherie von Langerhans-Inseln in den α -Granula von A-Zellen zusammen mit Glucagon gespeichert. Im Gastrointestinaltrakt wird es in A-ähnlichen Zellen in der Korpus/Fundus-Region des Magens und in L-Zellen von Dünn- und Dickdarm gefunden, wobei die höchsten Konzentrationen in Ileum und Kolon vorliegen (Eissele et al., 1991). GLP-1 wird auf gewisse Stimuli hin (z.B. Anwesenheit von Nährstoffen im Gastrointestinaltrakt) zusammen mit pankreatischem Glucagon und intestinalem Glicentin in die Blutbahn abgegeben (Orskov et al., 1986). Unklar ist, ob dieses peripher freigesetzte GLP-1 mit dem zentralnervösen GLP-1-System interagiert. Die Plasmaspiegel für GLP-1 betragen zwischen 2-15 pmol/l (gefastet) und 20-50 pmol/l (postprandial; Nauck, 1998). Der Abbau von GLP-1 erfolgt vor allem bei der Ratte sehr rasch (Plasma-Halbwertszeit ca. 5 min) durch das Enzym Dipeptidyl Peptidase IV, welche das Hormon in eine inaktive oder sogar antagonistische Form überführt (Nauck, 1998; Perfetti et al., 2000). Aufgrund dieses raschen Abbaus von GLP-1 verwendeten wir für unsere Versuche das länger wirksame, sehr potente GLP-1-Analogon Exendin-4, welches prinzipiell die gleichen Wirkungen aufweist wie GLP-1.

4.1.3. Wirkungen von GLP-1

4.1.3.1 Wirkungen auf das endokrine Pankreas

GLP-1 ist ein sogenanntes Inkretin, d.h. ein Hormon mit insulinotroper Wirkung, das die Insulinfreisetzung, welche durch die absorbierte Glucose ausgelöst wird potenziert (Holst et al., 1987; Mojsov et al., 1987; Orskov et al., 1988). Die Wirkung von GLP-1 ist dabei gebunden an die Anwesenheit von Glucose. Der Synergismus zwischen dem erhöhten Blutglucosespiegel und GLP-1 ist ein

rezeptorvermitteltes Phänomen und spielt sich höchstwahrscheinlich an K⁺-Kanälen ab (Holz et al., 1993). GLP-1 erhöht in Anwesenheit von Glucose die Sekretionsleistung jeder einzelnen Zelle, bewirkt aber auch, dass insgesamt mehr Zellen Insulin freisetzen (Montrose-Rafizadeh et al., 1994). Es kann somit die β -Zellen für Glucose sensibilisieren und sogar glucoseresistenten Zellen ihre Glucose-Kompetenz zurückgeben (Holz et al., 1993). Die synergistische Wirkung von Glucose und GLP-1 wird noch verstärkt durch die Möglichkeit von GLP-1, in den Glucose-Metabolismus einzugreifen. So bewirkt GLP-1 an den β -Zellen des Pankreas neben einer gesteigerten Insulinbiosynthese auch eine erhöhte mRNA-Synthese für den Glucose-Transporter GLUT-2 und das für die Glucose-Verstoffwechselung nötige Enzym Glucokinase (Wang et al., 1995; Wang et al., 1997).

4.1.3.2 Wirkungen auf den Gastrointestinaltrakt und die Appetitregulation

Aufgrund des Zeitpunktes der GLP-1-Ausschüttung, nämlich im Anschluss an eine Mahlzeit, und in Anbetracht der Lokalisation von GLP-1-Rezeptoren in ZNS-Gebieten, welche an der Regulation der Futteraufnahme beteiligt sind, wurde vermutet, dass es sich bei dieser Substanz um einen endogenen Sättigungsfaktor handeln könnte (Turton et al., 1996). Sowohl *Turton et al. (1996)* als auch *Meeran et al. (1999)* zeigten, dass GLP-1 bei Ratten nach intracerebroventrikulärer Verabreichung zu einer verminderten Futteraufnahme führt, und dass dieser Effekt durch den GLP-1-Rezeptor-Antagonisten Exendin(9-39) aufgehoben wird (Turton et al., 1996). Ausserdem führt die alleinige, mehrtägige Verabreichung von Exendin(9-39) zu einer gesteigerten Futteraufnahme und einer Körpergewichtszunahme (Meeran et al., 1999). *Meeran et al. (1999)* konnte auch belegen, dass nach mehrtägiger ICV-Infusion von GLP-1 eine Körpergewichtsreduktion eintritt. *Larsen et al. (2001)* wies schliesslich auch nach intravenöser Verabreichung von GLP-1 eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme nach, die wiederum durch Exendin(9-39) aufgehoben werden konnte.

Die anorektische Wirkung von GLP-1 scheint einerseits zentral vermittelt zu werden (Turton et al., 1996; Tang-Christensen et al., 1996; Tang-Christensen et al., 1998), andererseits könnte eine weitere Ursache der verminderten

Futteraufnahme eine durch GLP-1 ausgelöste Reduktion der Magenentleerungsrate sein (Flint et al., 2001). Bei Ratten wird nach peripherer und zentraler Applikation von GLP-1 die Magenentleerung nämlich signifikant verzögert (Imeryüz et al., 1997), bei Versuchen am Menschen wird Gleiches auch nach intravenöser Verabreichung beobachtet (Näslund et al., 1999).

Weitere Wirkungen von GLP-1 am Gastrointestinaltrakt sind die Verminderung der Magensäuresekretion (Wettergren et al., 1998) und eine herabgesetzte Dünndarmmotorik (Giralt et al., 1998; Tolessa et al., 1998).

Es scheint jedoch, dass GLP-1 nicht ohne Vorbehalt als klassisches Sättigungspeptid eingeordnet werden kann, denn sein anorektischer Effekt scheint zumindest teilweise auch auf einer erlernten Geschmacksaversion (CTA) zu beruhen. So konnte gezeigt werden, dass nach zentraler GLP-1-Infusion in Dosierungen, welche eine Reduktion der Futteraufnahme hervorriefen, Ratten auch eine CTA entwickelten (van Dijk et al., 1997; Thiele et al., 1997). Ausserdem besteht nach *Van Dijk et al. (1999)* vor allem in Hirnstammregionen, die an der Vermittlung einer erlernten Geschmacksaversion (CTA) beteiligt sind (NTS, AP, PBN), eine grosse Ähnlichkeit zwischen dem c-Fos-Muster von intracerebroventrikulär verabreichtem GLP-1 und jenem von intraperitoneal appliziertem LiCl, welches bekannt ist für seine stark aversiven Effekte (Nachman et al., 1973). *Rinaman (1999)* konnte schliesslich zeigen, dass die durch LiCl ausgelöste CTA durch einen GLP-1 Antagonisten aufgehoben werden kann. Generell sind jedoch für die Vermittlung von aversiven Effekten und Sättigung verschiedene Zentren zuständig (siehe Kap.4.1.3.3).

4.1.3.3 Wirkungsorte

Im Zentralnervensystem sind die Rezeptoren für GLP-1 in Hypothalamus und Hirnstamm besonders zahlreich (Kanase et al., 1988, Alvarez et al., 1996). Im Hypothalamus wurde GLP-1-Rezeptor-mRNA vor allem in den Nuclei supraopticus, paraventricularis und arcuatus gefunden (Shughrue et al., 1996). Immunhistochemische Studien bestätigten, dass intracerebroventrikulär verabreichtes GLP-1 Neurone in diesen Gebieten und in Teilen des Hirnstammes (AP und NTS) aktiviert (Larsen et al., 1997b). *Tang-Christensen et al. (1998)* zeigten schliesslich, dass der Nucleus arcuatus eine zentrale Rolle in der

Vermittlung des verzehrsreduzierenden Effekts von zentral appliziertem GLP-1 zu spielen scheint. Bei Ratten, bei denen der Nucleus arcuatus mit Mono-Natrium-Glutamat (MSG) zerstört worden war, blieb nämlich zentral verabreichtes GLP-1 ohne Wirkung. GLP-1 hemmt ausserdem die durch NPY ausgelöste Verzehrssteigerung (Turton et al., 1996), wobei dies wiederum bei MSG-behandelten Ratten nicht beobachtet werden konnte (Tang-Christensen et al., 1998). *Tang-Christensen et al. (1998)* schlossen daraus, dass GLP-1 mit inhibitorischen Neuronen des Nucleus arcuatus interagiert, welche zu entfernten Neuronen des Hypothalamus projizieren, die dort den Effekt von NPY vermitteln. Wie bereits erwähnt, scheint GLP-1 sowohl einen Sättigungseffekt als auch eine CTA auszulösen. Dabei existieren für GLP-1 wahrscheinlich zwei unabhängige Wege, Sättigung und Aversion zu vermitteln. Läsionsstudien lieferten Hinweise darauf, dass die Sättigungswirkung von GLP-1 über den Nucleus paraventricularis (PVN), der aversive Effekt hingegen über den zentralen Nucleus der Amygdala (ceA) vermittelt werden könnte (van Dijk et al., 1999).

Neben den genannten Regionen des Hypothalamus aktiviert GLP-1 mit der AP und dem NTS auch Regionen des Hirnstammes, welche an der Vermittlung der starken anorektischen Wirkung von Amylin beteiligt sind (Rowland et al., 1997). Da zudem gezeigt werden konnte, dass GLP-1 die Freisetzung von Amylin stimuliert (Inoue et al., 1991), interessierte uns, ob die Wirkung von GLP-1 bzw. Exendin-4 (langwirksames GLP-1-Analogon; siehe 4.1.3.4.) auf das Verzehrsverhalten von Ratten über die Freisetzung von Amylin und damit über ähnliche zentralnervöse Mechanismen vermittelt wird. Von Amylin ist bekannt, dass eine subdiaphragmatische Vagotomie den anorektischen Effekt nicht aufzuheben vermag, was auf eine direkt zentral vermittelte Wirkung schliessen lässt (Lutz et al., 1995), wobei die AP und das histaminerge System eine zentrale Rolle spielen (Lutz et al., 1998b; Mollet et al., 2001). In dieser Arbeit wurde deshalb an AP-lädierten Ratten, an H₁Rko-Mäusen und an subdiaphragmatisch vagotomierten Ratten eine allfällige Beteiligung dieser Systeme an der Effektvermittlung des langwirksamen GLP-1-Analoga Exendin-4 abgeklärt.

4.1.3.4 Exendin-4: GLP-1-Agonist

Exendin-4 ist ein aus 39 Aminosäuren bestehendes Peptid, das aus dem Speicheldrüsensekret von *Heloderma suspectum* isoliert wurde (Eng et al., 1992). Exendin-4 weist 53 % Sequenzhomologie mit GLP-1 auf, bindet an die gleichen Rezeptoren wie dieses und aktiviert sie (Göke et al., 1993, Thorens et al., 1993). Für Exendin-4 sind ähnliche Wirkungen wie für GLP-1 nachgewiesen worden. Es vermag den postprandialen Glucosespiegel zu senken, verzögert die Magenentleerung und vermindert die Nahrungsaufnahme (Edwards et al., 2001). Ob dieser verzehrsreduzierende Effekt von Exendin-4, ähnlich wie derjenige von GLP-1, auf eine erlernte Geschmacksaversion zurückzuführen ist, war eine weitere Fragestellung dieser Arbeit.

Neben den genannten Wirkungen vermag Exendin-4 sowohl in vitro als auch in vivo eine Stimulation der glucoseinduzierten Insulinausschüttung auszulösen (Parkes et al., 2001). Es zeigt jedoch eine wesentlich grössere Wirksamkeit und längere Wirkungsdauer als GLP-1, was auf seine längere Halbwertszeit zurückzuführen sein könnte (Edwards et al., 2001; Parkes et al., 2001).

Aufgrund dieser Tatsache wird Exendin-4 als mögliches Medikament zur Behandlung von Typ 2 Diabetes mellitus diskutiert. *Young et al. (1999)* und *Szayna et al. (2000)* konnten in verschiedenen Tiermodellen des Typ 2 Diabetes zeigen, dass Exendin-4 den Blutglucosespiegel senkt und nach chronischer Applikation zu einer Reduktion von Futterverzehr und Körpergewicht sowie einer besseren Insulinantwort auf einen Glucosestimulus führt. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch *Egan et al. (2002)* in einer Studie mit Menschen, die einen Typ 2 Diabetes aufwiesen. Es scheint, dass diese Effekte durch Vergrößerung der β -Zellmasse bewirkt werden, welche bei längerer Gabe von Exendin-4 durch Replikation und Differenzierung von Inselzellen ausgelöst wird (Xu et al., 1999).

4.2. Ghrelin

4.2.1. Geschichte

1975 wurde der natürliche Ligand für den Morphin-Rezeptor entdeckt, und in der Folge wurden viele Opioid-Derivate synthetisiert mit dem Ziel, diese bei geringerem Suchtpotenzial bezüglich der Analgesie wirkungsvoller zu machen (Kojima et al., 2001). 1976 entdeckte Cyril Y. Bowers von der Tulane Universität in New Orleans, USA, im Zusammenhang mit der Entwicklung von synthetischen Opioid-Derivaten, dass diese eine schwache wachstumshormonausschüttende Wirkung besitzen (Bowers et al., 1980). Damit begann die Entwicklung von kleinen synthetischen Molekülen (GHSs; Growth hormone secretagogues), welche über die Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GHS-R) zu einer stärkeren Ausschüttung des Wachstumshormons führten. 1996 wurde dieser Transmembranrezeptor identifiziert (Smith et al., 1999). Noch war aber kein natürlicher Ligand für diesen Rezeptor bekannt. *Kojima et al. (1999)* bestimmten schliesslich über den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg in den Zellen einer Zellkultur, die den GHS-R exprimierte, dass der grösste Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, und damit die stärkste Stimulation des GHS-R, durch Extrakte des Rattenmagens erfolgte. Diese Extrakte wurden mittels chromatographischer Methoden weiter gereinigt und dem gefundenen natürlichen Peptid der Name Ghrelin (ghre=wachsen) gegeben (Kojima et al., 1999).

4.2.2. Struktur und Vorkommen

Ghrelin ist ein lineares, aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptid mit einem Molekulargewicht von 3314. Einzigartig für Säugetiereptide ist die posttranslationelle Addition einer Octanoyl-Gruppe, kovalent gebunden an den dritten Serinrest. Ohne diese Gruppe ist Ghrelin biologisch inaktiv (Bowers, 2001). Zwischen Ghrelin und anderen GHSs gibt es keine strukturellen Homologien, jedoch zeigen Sequenzvergleiche, dass zwischen Ghrelin und Motilin eine partielle Homologie besteht (Kojima et al., 2001). Mittels

chromatographischer Methoden und Radioimmunoassay konnte gezeigt werden, dass Ghrelin bei Ratten vor allem im Gastrointestinaltrakt produziert wird, wobei die grössten Konzentrationen im Fundus des Magens festgestellt wurden (Date et al., 2000). *Date et al. (2000)* fand auch, dass Ghrelin in sogenannten X/A-ähnlichen Zellen, welche in der Submucosa des Magens liegen, in runden, kompakten, elektronendichten Granula gespeichert wird, und dass diese Zellen in engem Kontakt mit den Kapillaren, nicht aber mit dem Magenlumen stehen. Diese Tatsache und die Bestimmung der Ghrelinkonzentration in menschlichem Blutplasma (100-120 pmol/l Ghrelin) deuten darauf hin, dass Ghrelin nicht in den Gastrointestinaltrakt sezerniert, sondern in Blutgefässe abgegeben wird (Kojima et al., 2001). Viel geringere Mengen Ghrelin werden auch von Darm, Hypophyse, Niere, Plazenta und Hypothalamus produziert. Es wird vermutet, dass diese Organe die Ghrelinproduktion kompensatorisch steigern können, wird doch nach einer Gastrektomie der Plasmaghrelinspiegel nur um 65% reduziert (Horvath et al., 2001). Die Freisetzung von Ghrelin erfolgt pulsatil, wobei die Sekretionsfrequenz bei gefasteten Tieren massiv zunimmt (Bagnasco et al., 2002)

4.2.3. Wirkungen von Ghrelin

4.2.3.1 Einfluss von Ghrelin auf die Wachstumshormonausschüttung

Nach intravenöser Verabreichung bewirkt Ghrelin an der Hypophyse der Ratte eine sehr effiziente Ausschüttung des Wachstumshormons, ohne die Freisetzung anderer Hypophysenhormone zu beeinflussen (Kojima et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnte beim Menschen nach einer intravenösen Applikation von Ghrelin neben einer Wachstumshormon-Ausschüttung auch eine Erhöhung des ACTH- (adrenokortikotropes Hormon), Kortisol- und Prolaktinspiegels beobachtet werden, während die Plasmakonzentrationen für andere Hypophysenvorderlappen-Hormone keine signifikanten Änderungen erfuhren (Takaya et al., 2000). Ghrelin scheint jedoch zumindest bei der Ratte nach intrazerebroventrikulärer Infusion nur die Freisetzung des Wachstumshormons und nicht dessen Synthese zu beeinflussen (Date et al., 2000). Sowohl im

Vergleich mit einem synthetischen GHS, wie Hexarelin (Arvat et al., 2001), als auch mit GHRH (Wachstumshormon-Releasing-Hormon; Seoane et al., 2000) ist der Effekt von Ghrelin auf die Wachstumshormonausschüttung stärker. Die Wirkung von Ghrelin auf die Somatotropinausschüttung kommt einerseits durch seine Bindung an den GHS-R in der Hypophyse zustande, andererseits durch eine Aktivitätssteigerung von GHRH-sezernierenden Neuronen des Hypothalamus und einen funktionellen Somatostatin-Antagonismus (Broglia et al., 2001).

4.2.3.2 Einfluss von Ghrelin auf die Appetitregulation

Während einer Studie zur somatotropinausschüttenden Wirkung von Ghrelin am Menschen stellten 3 von 4 Probanden als Nebeneffekt ein Hungergefühl fest (Arvat et al., 2000). In verschiedenen Studien konnte seither gezeigt werden, dass sowohl zentral als auch peripher verabreichtes Ghrelin die Futteraufnahme steigert. *Tschöp et al. (2000)* zeigten, dass der erhöhte Futtermittelverzehr mit einer Körpergewichtszunahme einhergeht, wobei diese fast ausschliesslich auf eine Zunahme der Körperfettmasse zurückzuführen ist. *Nach Tschöp et al. (2000)* ist dieser vermehrte Ansatz von Körperfett auf einer gesteigerten Verstoffwechselung von Kohlenhydraten bei gleichzeitig reduzierter Fettverstoffwechselung und allgemein reduziertem Energieverbrauch begründet. Ghrelin scheint dabei ein direkter funktioneller Gegenspieler von Leptin zu sein, der dessen verzehrsreduzierende Wirkung durch Aktivierung des NPY-Systems antagonisiert (Shintani et al., 2001). So konnte gezeigt werden, dass sowohl die gleichzeitige ICV-Infusion von Ghrelin und eines Y1-Rezeptor Antagonisten (Asakawa et al., 2001) als auch die ICV-Applikation von NPY-Antikörpern vor einer Ghrelin-Infusion (Nakazato et al., 2001) die gesteigerte Futteraufnahme aufhoben. Neben NPY scheint jedoch auch das AGRP-System an der Vermittlung des verzehrssteigernden Effektes von Ghrelin beteiligt zu sein. *Tschöp et al. (2002)* konnten in Versuchen mit Mäusen, denen durch einen genetischen Defekt NPY fehlt, belegen, dass die chronische Applikation eines Ghrelin-Rezeptor-Agonisten trotzdem zu einer Zunahme von Futtermittelverzehr und Körpergewicht führt und dabei der Gehalt an AGRP-mRNA im Hypothalamus ansteigt.

Die gesteigerte Futteraufnahme durch Ghrelin wird zusätzlich auch durch eine beschleunigte Magenentleerung unterstützt. Ghrelin bewirkt dabei eine Zunahme der Magenmotilität in Frequenz und Amplitude (Masuda et al., 2000; Asakawa et al., 2001). Ausserdem wird am Magen durch Ghrelin eine Steigerung der Magensäuresekretion hervorgerufen, wobei alle genannten Effekte am Magen durch eine Vagotomie oder eine Vorbehandlung mit Atropin aufgehoben werden konnten (Masuda et al., 2000; Date et al., 2001).

Die ghrelininduzierte Verzehrssteigerung scheint unabhängig von der ghrelinvermittelten Ausschüttung von Somatotropin zu sein. So wurde auch bei Ratten mit einem Defekt am Somatotropin-Gen eine Zunahme des Futtermittels nach ICV-Infusion von Ghrelin festgestellt (Nakazato et al., 2001). Eine ICV-Infusion mit GHRH-Antikörpern veränderte den Ghrelineffekt ebensowenig (Wren et al., 2000).

Dass Ghrelin als wichtiger physiologischer Mediator der Futteraufnahme fungieren könnte, unterstreichen auch die Experimente von *Tschöp et al. (2000)*, die zeigen, dass die Konzentration von Ghrelin im Blut von gefasteten Ratten ansteigt, um nach Futtergabe auf Werte von ad libitum gefütterten Ratten abzusinken. Die Schaffung einer positiven Energiebilanz und die Steigerung der Wachstumshormon-Ausschüttung durch Ghrelin lassen einen grossen Stellenwert dieses Hormons vor allem in der Wachstumsphase vermuten. So könnten durch Ghrelin die anabolen Vorgänge durch die gleichzeitig effiziente Bereitstellung von Energie unterstützt werden. In dieser Arbeit wird deshalb die Wirkung von Ghrelin bei jungen und älteren adulten Ratten verglichen (Def.: siehe Kap. 5.1).

4.2.4. Wirkungsorte von Ghrelin

Der starke verzehrssteigernde Effekt von Ghrelin nach ICV-Infusion lässt auf eine zentrale Vermittlung desselben schliessen (Tschöp et al., 2000), und Experimente von *Yokote et al. (1998)* belegen, dass der GHS-Rezeptor in verschiedenen Gebieten des Hypothalamus vorkommt, welche bei der Regulation der Futteraufnahme eine wichtige Rolle spielen. Mit c-fos-Studien, welche zeigten, dass systemisch appliziertes Ghrelin zu einem Anstieg von c-fos-positiven

Neuronen im Nucleus arcuatus führen, wurde diese Vermutung bestätigt. Die gleichen Experimente bei gefasteten Ratten bewirkten einen dreifach gesteigerten Effekt (Hewson et al., 2000).

Elektrophysiologische Studien zeigten ausserdem, dass durch Ghrelin Neurone des ventromedialen Nucleus arcuatus (ArcM) aktiviert werden, während es im ventrolateralen Nucleus arcuatus (ArcL) durch Ghrelin zu einer Hemmung von Neuronen kommt (Riediger et al., im Druck). Im ArcM kommen vor allem NPY-produzierende Neurone vor, während im ArcL Proopiomelanocortin (POMC)-Neurone gefunden werden, die das anorektisch wirkende Peptid α -MSH produzieren (Broberger et al., 1997). Es scheint somit denkbar, dass zirkulierendes Ghrelin die NPY-Neurone des ArcM erreicht und aktiviert. *Riediger et al. (eingereicht)* spekulierten, dass diese ghrelinaktivierten Zellen einerseits zu orexigenen Zellen des Nucleus paraventricularis projizieren, andererseits aber auch zu POMC-Neuronen des ArcL, welche durch die Ghrelin-stimulierte NPY-Freisetzung gehemmt werden.

Nakazato et al. (2001) wiesen schliesslich auch in anderen, für die Regulation der Futteraufnahme wichtigen Hirnarealen c-fos-Expression nach Ghrelininfusion nach. So scheint Ghrelin auch die AP/NTS- Region des Hirnstammes zu aktivieren (Lawrence et al., 2002). Ob die Verzehrssteigerung durch Ghrelin über dessen Fähigkeit, die AP zu aktivieren, vermittelt wird, ist eine weitere Frage, mit der sich diese Arbeit befasst.

4.3. Leptin

Leptin ist ein aus 166 Aminosäuren bestehendes Polypeptid (Masuzaki et al., 1995) mit einem Molekulargewicht von 16 kD (Pelleymounter et al., 1995). Das Leptin Gen (ob Gen) wird vor allem von Adipocyten exprimiert (Masuzaki et al., 1995), und es besteht eine Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von Leptin und der Grösse der Fettdepots (Considine et al., 1996). Zudem wird Leptin auch im Magen (Bado et al., 1998; Cinti et al., 2000) und in der Plazenta produziert (Masuzaki et al., 1997). Bei der Elimination von Leptin aus dem Blut scheinen vor allem die Nieren eine wichtige Rolle zu spielen (Meyer et al., 1997). Die Geschichte von Leptin geht eigentlich zurück auf die späten 40-er Jahre, als in den USA in einer Labormäusepopulation Spontanmutationen festgestellt

wurden (ob/ob Mäuse), die mit einer enormen Körpergewichtszunahme einhergingen (Trayhurn et al., 1999). Die Identifikation des Leptin-Gens (ob Gen) und seines Proteinproduktes durch *Zhang et al. (1994)* unterstützen die Theorie des lipostatischen Signals, welche von *Kennedy* schon 1953 aufgestellt wurde. *Kennedy* postulierte, dass ein sogenanntes lipostatisches Signal das Zentralnervensystem dauernd über die aktuellen Fettreserven informiert, und dass dieses allenfalls über eine Veränderung der Energieaufnahme bzw. -abgabe regulierend eingreifen kann. Experimente mit ob/ob Mäusen, die aufgrund der erwähnten Mutation kein Leptin produzieren, zeigten, dass Leptin tatsächlich ein wichtiger Regulator von Körpergewicht und Fettreserven ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine tägliche Injektion von Leptin über mehrere Tage bis Wochen zu einem verminderten Futterverzehr, einer Körpergewichtsreduktion, vermehrter körperlicher Aktivität sowie zu einem Absinken der Plasmakonzentration von Insulin und Glucose führen (Halaas et al., 1995, Pelleymounter et al., 1995, Weigle et al., 1995). Der Effekt von Leptin auf die Futteraufnahme scheint dabei im wesentlichen vom Hypothalamus vermittelt zu werden (Mercer et al., 1996, Guan et al., 1997). Da aber in der AP ebenfalls Leptin-Rezeptoren vorkommen (Lin et al., 2000), klärten wir eine allfällige Beteiligung der AP an der Wirkungsvermittlung von Leptin mit AP-lädierten Tieren ab.

5. Tiere, Material und Methoden

5.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Mit Ausnahme der Versuche 3-5 wurden alle Experimente mit männlichen Ratten des Stammes Wistar durchgeführt. Sie wurden von Biological Research Laboratories Ltd. (Füllinsdorf, Schweiz) bezogen. Für die Experimente 10-13 wurden intensiv wachsende, junge adulte Ratten bis zu einem durchschnittlichen Körpergewicht von maximal 160g benutzt. Die restlichen Experimente wurden mit älteren adulten Ratten durchgeführt, deren durchschnittliches Körpergewicht über 300g betrug. Für die Experimente 3-5 wurden männliche Wildtyp (Wt)-Mäuse (ebenfalls von Biological Research Laboratories Ltd.) und männliche Histamin-H₁-Rezeptor-knockout (H₁Rko)-Mäuse (T. Watanabe, Kyushu University, Japan) des Stammes C57BL, welche am Institut für Labortierkunde der Universität Zürich weitergezüchtet wurden, verwendet.

Für die Haltung der Tiere standen unterschiedliche Käfigmodelle zur Verfügung (siehe 5.2). Nach der Einstellung wurden die Tiere rund 2 Wochen an die Haltungsbedingungen (Käfige, Temperatur, Lichtzyklus, Futter) und die Manipulationen (Herausnehmen, Wiegen, Injektionen) gewöhnt. Die automatisch geregelte Raumtemperatur betrug 21±1 °C und es herrschte ein künstlicher Hell-Dunkel-Lichtzyklus von 12 Stunden.

Lichtprogramm:

Ratten:	hell	6.00- 18.00
	dunkel	18.00- 6.00

Ausnahme: Exp.17:

<i>hell</i>	<i>8.00-20.00</i>
<i>dunkel</i>	<i>20.00- 8.00</i>

Mäuse: hell 21.00- 9.00
 dunkel 9.00-21.00

Gefüttert wurde, je nach Versuch, eine Mittelfett- (MF) oder eine Hochkohlenhydrat (HK)-Diät. Die energetische Dichte betrug in beiden Fällen 16.5 kJ/g. Sowohl Futter als auch Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Ein allfälliger Futterentzug vor einem Versuch wird an der entsprechenden Stelle erwähnt (Futterzusammensetzung siehe Tabellen 1, 2, 3).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Diäten in %
(MF: Kliba Mühlen, Art. 2100, Kaiseraugst, Schweiz)

	MF	HK
Kalzium-Kaseinat	12.87	12.87
Maisstärke	40.00	76.67
Sojaöl	3.47	3.33
Rindertalg	9.42	
Schweineschmalz	5.17	
Mineralstoffmischung ¹	4.00	4.00
Vitaminmischung ²	3.00	3.00
DL-Methionin	0.13	0.13
Polyäthylenpulver ³	16.00	
Total	100.00	100.00

¹ Mineralstoffmischung s. Tabelle 2

² Vitaminmischung s. Tabelle 3

³ Lupolen, BASF (Ludwigshafen, BRD)

Tabelle 2: Zusammensetzung der Mineralstoffmischung (Gehalt in 100g)

(Kliba Mühlen, Art. 724)

Ca	16.21 g
P	8.08 g
Na	6.63 g
K	9.01 g
Mg	3.90 g
Cl	10.20 g
Mn	66.46 mg
Fe	292.25 mg
Cu	17.35 mg
Zn	41.06 mg
I	2.68 mg
F	6.31 mg
Co	1.27 mg
Se	0.90 mg

Tabelle 3: Zusammensetzung der Vitaminmischung (Gehalt in 100 g)

(Kliba Mühlen, Art.Nr.750)

Vitamin A	70000 IE
Vitamin D3	7000 IE
Vitamin E	491 mg
Vitamin C	180 mg
Vitamin B1	100 mg
Vitamin B2	60 mg
Vitamin B6	45 mg
Vitamin B12	120 mg
Nikotinsäure	180 mg
Pantothensäure	150 mg
Folsäure	10 mg
Biotin	3 mg
Cholin	1880 mg

5.2. Käfigmodelle und Messmethoden

5.2.1. Einzelhaltung in Drahtgitterkäfigen

Die Ratten wurden in den versuchsfreien Zeiträumen und für einen Teil der Versuche einzeln in Drahtgitterkäfigen gehalten. Es wurde ein Käfigmodell mit der Grundfläche von 47×24 cm und einer Höhe von 18cm verwendet, an denen innen die Futternäpfe und aussen die Wasserflaschen angebracht waren.

Die Mäuse wurden ebenfalls in Drahtgitterkäfigen gehalten. Die Grundfläche betrug 25x24 cm und die Höhe 18cm. Wiederum wurden aussen die Wasserflaschen und innen die Futternäpfe befestigt, wobei das Futter in kleinen Confitürengläsern in die Näpfe gestellt wurde, um ein zu starkes Verstreuen des Futters zu vermeiden.

5.2.1.1 Messung der kumulativen Futteraufnahme

Die Futternäpfe wurden zu Beginn eines Experiments auf 0.1 g genau gewogen (Mettler PM 2000, Mettler Toledo Instrumente AG, Greifensee, CH) und nach Injektion der zu untersuchenden Substanzen in die Käfige verbracht. Zu den angegebenen Messzeitpunkten wurden die Futternäpfe erneut gewogen, wobei Kot so gut wie möglich aus den Näpfen entfernt wurde. Von den Tieren auf die Kotbleche verstreutes Futter wurde mit Zeitungspapier aufgefangen, gewogen und bei der Berechnung des Futterverzehr berücksichtigt.

5.2.2. Einzelhaltung in Makrolonkäfigen mit automatischer Erfassung des Verzehrsmusters

Für diese Versuche standen 24 Makrolonkäfige mit einer Grundfläche von 21×37cm und einem Gitterboden und -deckel zur Verfügung, in denen die Ratten einzeln gehalten wurden. Die Käfige waren so konstruiert, dass die Ratten, um an das Futter zu gelangen, durch ein Rohr (Länge 16 cm, Durchmesser 8cm) kriechen mussten, das am Ende um 90 Grad abgewinkelt war und, durch ein

grobmaschiges Drahtgitter abgeschlossen, in den Futternapf mündete. Eine um den Futternapf angebrachte Kartonmanschette erlaubte die Mitberücksichtigung von allfällig verstreutem Futter. Die Trinkflasche war aussen am Käfig angebracht.

Der Futternapf stand auf einer elektronischen Waage (Mettler PE 300 oder Mettler Toledo PG 802-S), welche Gewichtsänderungen registrierte und über einen 24-Kanal-Multiplexer (Krügel, München, Deutschland) an einen Computer übermittelte. Dieser war so programmiert, dass das Gewicht alle 30 s abgefragt wurde. Eine Mahlzeit (MZ) wurde wie folgt definiert:

Mahlzeitendauer:	mind. 1 min
Mahlzeitengrösse:	mind. 0.3 g
Mahlzeitenende:	Mahlzeit gilt als beendet, wenn innerhalb von 15 min keine erneute Gewichtsabnahme erfolgt.

Mit Hilfe des Computers konnte so für jede Ratte nicht nur die kumulative Futteraufnahme, sondern auch die Mahlzeitengrösse (g), die jeweilige Mahlzeitendauer (min), das Mahlzeitenintervall (min; Zeit vom Ende einer Mahlzeit bis zum Beginn der nächsten Mahlzeit), die Latenz der Nahrungsaufnahme (min; Zeit von der Injektion bis zum Beginn der ersten Mahlzeit) und die Anzahl der Mahlzeiten bestimmt werden.

5.3. Gruppeneinteilung

Die Gruppeneinteilung wurde am Vortag des Versuches unter Berücksichtigung des Körpergewichtes vorgenommen. Versuchs- und Kontrollgruppen wurden so eingeteilt, dass sie im Durchschnitt ein ähnliches Körpergewicht aufwiesen.

5.4. Intraperitoneale Injektion

Zur Injektion wurden sterile Einwegspritzen (Omnifix 1ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) und -kanülen (Terumo, 26 G x ½, Leuven, Belgien) verwendet. Die Injektionsstelle befand sich in der Mitte des Abdomens zwischen Processus xyphoideus und Präputium im Bereich der Linea alba. Das Injektionsvolumen

wurde dem Körpergewicht der Tiere angepasst und betrug bei den Ratten zwischen 10ml/kg (\emptyset KGW < 100g) und 1ml/kg (\emptyset KGW > 100g) und bei den Mäusen 10ml/kg KGW.

5.5. Verwendete Substanzen

Sämtliche Substanzen wurden unmittelbar vor der Applikation in steriler, physiologischer NaCl-Lösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Ghrelin und Exendin-4 wurden von Bachem AG (Bubendorf, CH) und Leptin von R&D Systems, Europe Ltd. (Oxon, UK) bezogen.

5.6. Area postrema-Läsionen

Die Ratten wurden 12h vor der Operation antibiotisch vorbehandelt (100 mg/kg KGW s.c.; Chloramphenicolum 10%, G. Streuli&Co. AG, Uznach, CH). Am Operationstag wurden die ca. 300g schweren Ratten zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Bei der einen Gruppe wurde die Area postrema zerstört (AP-X), bei der anderen hingegen nur eine Scheinläsion vorgenommen (SHAM).

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid (60 mg/kg KGW i.p.; Narketan-10[®], Chassot&Cie AG, Belp, CH) und Xylazinhydrochlorid (7.0 mg/kg KGW i.p.; Rompun[®] 2%, Bayer, Leverkusen, BRD) anästhesiert. Als Analgetikum erhielten sie Buprenorphin (0.1 mg/kg KGW s.c.; Temgesic[®], Essex Chemie AG, Luzern, CH).

Das Operationsfeld wurde grosszügig ausgeschoren und desinfiziert, die Kornea mit einer Augensalbe (Vitamin-A-Dispersa, CIBA Vision AG, Niederwangen, Schweiz) vor Austrocknung geschützt. Anschliessend erfolgte ein medianer Hautschnitt beginnend auf Höhe der Ohrenbasis bis mindestens 3cm kaudal des Atlanto-Occipitalgelenkes. Die darunterliegende Muskulatur wurde stumpf durchtrennt und das Foramen magnum freigelegt. Die Ratten mussten dann mit maximaler Beugung des Kopfes fixiert werden, so dass das Atlanto-Occipitalgelenk eröffnet und das Foramen magnum mit Hilfe eines Knochen-Rongeurs erweitert werden konnte. Nun hatte man den Blick frei auf das Kleinhirn und, nach leichtem Anheben dessen, auf die rötlich gefärbte Area postrema. Der Liquor wurde mit einer dünn gedrehten Spitze eines Wattestäbchens entfernt,

und bei den AP-X-Tieren mit derselben gleichzeitig die Area postrema entfernt. Dieser letzte Schritt unterblieb bei den SHAM-Tieren, die übrige Vorgehensweise war identisch. Anschliessend wurden Muskulatur (fortlaufende Naht) und Haut (Einzelknopfnah) wieder adaptiert (Vicryl® 3-0; Ethicon GmbH & Co., Norderstedt, BRD) und den Tieren zur Prophylaxe von Hirnödemen und Hirnschwellung einmalig Furosemidnatrium (1 mg/kg KGW s.c.; Lasix®, Hoechst Marion Roussel, Aventis Pharma AG, Zürich, CH) und Prednisolon (10 mg/kg KGW s.c.; Ultracorten-H®, Novartis Pharma AG, Bern, CH) verabreicht. Die postoperative Analgesie (einmal täglich Buprenorphin, 0.1 mg/kg KGW s.c.; Temgesic®, Essex Chemie AG, Luzern, CH) und Antibiose (einmal täglich 100 mg/kg KGW s.c.; Chloramphenicol 10%, G. Streuli & Co. AG, Uznach, CH) dauerten drei Tage.

5.7. Subdiaphragmatische Vagotomie (VAG) und Verifikation

Das Gewicht der dazu verwendeten männlichen Wistar-Ratten betrug ca. 200g. Die Narkose und die Operationsvorbereitungen entsprachen dem Vorgehen in Kap. 3.6.

Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte über eine Inzision in der Linea alba, welche vom Processus xyphoideus bis 1cm kaudal des Nabels geführt wurde. Mit Hilfe eines Retraktors wurde der Zugang offengehalten. Der Brustbeinknorpel wurde mit einer Arterienklemme (Kocher-Ochsner) nach kranial verlagert und über dem Kopf des Tieres befestigt.

Der Magen wurde vorgelagert und ein Haltefaden aus Seide (3-0; NC-Silk, Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) an einer wenig durchbluteten Stelle der grossen Krümmung des Magens befestigt. Mit einer am Haltefaden befestigten Klemme wurde der Magen nach kaudal gezogen, um eine bessere Übersicht über das Operationsfeld zu gewährleisten. Durch wiederholte Spülungen mit 0.9% NaCl-Lösung wurde eine Austrocknung von Magen und Darmschlingen verhindert.

Für eine bessere Darstellung des abdominalen Nervus vagus wurde das Leber-Zwerchfell-Band und das Leber-Magen-Band durchtrennt, und die Leber auf die rechte Seite des Abdomens verlagert. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden unter einem Operationsmikroskop (Wild® M7, Typ 352873, Heerbrugg, Schweiz) bei 12-facher Vergrößerung durchgeführt.

Der ventrale Vagusstamm wurde visualisiert und vorsichtig mit mikrochirurgischem Operationsbesteck freipräpariert. Im Abstand von 1cm wurde der Nerv zweimal mit Seide (4-0; NC-Silk, Braun) ligiert und mit einer Mikrofederschere (Aesculap, Tuttlingen, BRD) zwischen den Ligaturen durchtrennt. Das gleiche Verfahren wurde für den dorsalen abdominalen Vagusstamm angewendet.

Nach Beendigung des Eingriffs wurden die Organe wieder in die Bauchhöhle reponiert und das Peritoneum sowie die innere und äussere Bauchmuskulatur mit Sultan'schen Diagonalnähten, die Haut mit einer rückläufigen U-Naht verschlossen. Als Nahtmaterial wurde Vicryl[®] 3-0 (Ethicon GmbH & Co., Norderstedt, BRD) verwendet. Vor dem vollständigen Verschluss des Abdomens wurde als Infektionsprophylaxe i.p. 50mg/kg KGW Chloramphenicol verabreicht (Chloromycetin[®]-Succinat, Parke Davis, München, BRD).

Bei den scheinvagotomierten Tieren (SHAM) wurde chirurgisch genau gleich vorgegangen, mit dem Unterschied, dass die Nerven weder ligiert noch durchtrennt wurden.

Der Erfolg der Vagotomie wurde anhand zweier Funktionstests durchgeführt. Detaillierte Angaben dazu sind der Dissertation von Szabady (1995) zu entnehmen.

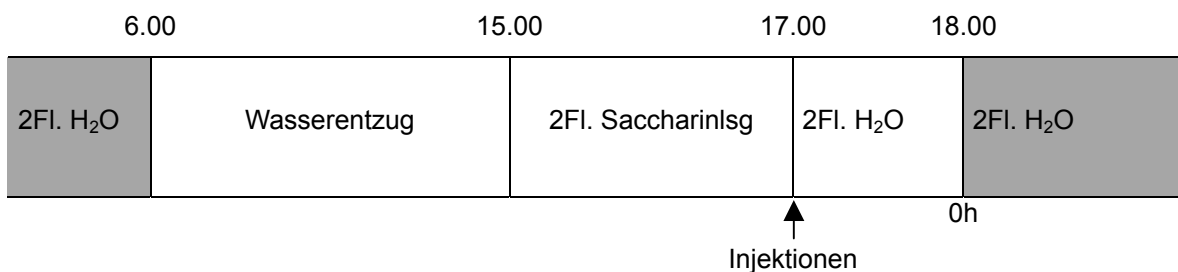
5.8. Nachweis einer Geschmacksaversion

Ziel dieser Untersuchung war es zu überprüfen, ob der verzehrsreduzierende Effekt von Exendin-4 bei Ratten auf eine erlernte Geschmacksaversion zurückzuführen ist. Die Injektion der zu testenden Substanz wurde dabei mit der kurzfristigen Präsentation einer neuartigen, für Ratten sehr schmackhaften 0.1%-Saccharin-Lösung (o-Benzoesäuresulfimid, Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH) kombiniert. 3 Tage nach der Konditionierung wurde den Ratten erneut die Saccharin-Lösung zusätzlich zum Trinkwasser angeboten und beurteilt, ob die Testsubstanz die Saccharinpräferenz verändert hatte (two bottle preference test). Für die Durchführung des Versuches dienten 32 Ratten, die noch nicht für andere Experimente verwendet wurden. Die Eingewöhnungszeit unter den üblichen

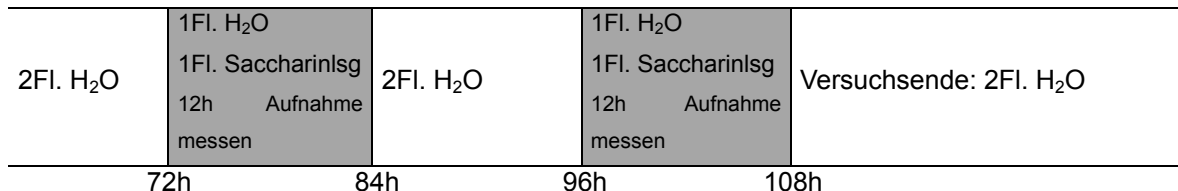
Haltungsbedingungen, aber mit zwei Wasserflaschen pro Tier dauerte ca. zwei Wochen.

Vor Versuchsbeginn wurden die Ratten in 4 Gruppen eingeteilt: Eine Kontrolle (NaCl), eine Positivkontrolle (LiCl: bekannt für seine starke Geschmacksaversion; Nachman et al., 1973), eine Negativkontrolle (Amylin: erwiesenermaßen nicht Aversions-auslösend; Szabady, 1995), und eine Gruppe, welche die Testsubstanz verabreicht bekam (Exendin-4). Der genaue zeitliche Ablauf des Versuches soll durch folgende Abbildung veranschaulicht werden:

Konditionierung:



Testtage:



Hellphase ☐

Dunkelphase ☒

Der Versuch wurde mit einem sogenannten Konditionierungstag eingeleitet, wobei den Ratten die besonders schmackhafte 0.1%-Saccharin-Lösung angeboten wurde. Dazu wurde den Tieren zu Beginn der Hellphase das Wasser entzogen. Drei Stunden vor Beginn Dunkelphase erhielten die Tiere je zwei Flaschen mit der erwähnten Saccharin-Lösung. Eine Stunde vor Beginn der Dunkelphase wurden die Tiere mit den entsprechenden Substanzen injiziert (Dosierung siehe Experiment 9). Unmittelbar danach erhielten die Tiere wieder zwei Flaschen mit reinem Trinkwasser. 72 respektive 96 Stunden nach der

Injektion fand die eigentliche Prüfung statt, ob die getesteten Substanzen zu einer Geschmacksaversion geführt hatten. Dazu wurde pro Tier eine Flasche reines Wasser und eine Flasche mit der 0.1%-Saccharin-Lösung über Nacht für 12 Stunden angeboten und die Flüssigkeitsaufnahme durch Wiegen der Flaschen gemessen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit einem ungepaarten t-Test und einer Varianzanalyse mit Folgetest nach Student-Newman-Keuls.

5.9. Statistik

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern ($\bar{X} \pm SE$). Gruppentausch bedeutet, dass jedem Tier in einem Durchgang Versuchs- und in einem anderen Durchgang Kontrollösung gespritzt wurde. Die verwendeten statistischen Tests sind bei den entsprechenden Experimenten vermerkt. In allen Fällen wurde ein p-Wert < 0.05 als signifikant angesehen. Die Versuche wurden wie folgt ausgewertet:

2 Gruppen <i>ohne</i> Gruppentausch:	t-Test für unabhängige Stichproben: ungepaarter Student's t-Test
2 Gruppen <i>mit</i> Gruppentausch:	t-Test für abhängige Stichproben: gepaarter Student's t-Test
mehr als 2 Gruppen <i>ohne</i> Gruppentausch:	einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit Folgetest (Student-Newman-Keuls)
mehr als 2 Gruppen <i>mit</i> Gruppentausch:	Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) mit Folgetest (Student-Newman-Keuls)
Überprüfung des Effekts der AP-Läsion auf die Substanzwirkung :	2-faktorielle ANOVA

6. Experimente und Ergebnisse

6.1. Untersuchungen zur Vermittlung des anorektischen Effekts von Exendin-4

Beim insulinotropen Hormon GLP-1 wurde schon mehrfach eine anorektische Wirkung nachgewiesen, und es wurde postuliert, dass es sich bei GLP-1 um einen wichtigen Regulator der Futteraufnahme und endogenen Sättigungsfaktor handeln könnte (Turton et al., 1996, Meeran et al., 1999, Larsen et al., 2001). Eine ICV-Infusion von GLP-1 aktiviert verschiedene Hirnareale, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, wie zum Beispiel Teile des Hypothalamus und des Hirnstammes (Larsen et al., 1997). Bei der Vermittlung des anorektischen Effektes von im Darm sezerniertem GLP-1 könnten verschiedene Mechanismen beteiligt sein. Einerseits könnte GLP-1 auf vagale Afferenzen wirken, wie *Imeryüz et al. (1997)* dies für die durch GLP-1 induzierte Hemmung der Magenentleerung gezeigt hat. Andererseits ist es möglich, dass peripheres GLP-1 auch via Blutzirkulation Rezeptoren im Gehirn erreicht (van Dijk et al., 1999). Ob GLP-1 überhaupt als klassisches Sättigungspeptid zu klassifizieren ist, ist aber noch fraglich. *Thiele et al. (1997)* und *van Dijk et al. (1997)* zeigten nämlich, dass GLP-1 bei Ratten eine erlernte Geschmacksaversion (CTA) auslösen kann. Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war deshalb ein CTA-Versuch, der Aufschluss darüber geben sollte, ob gleiches auch für den längerwirksamen GLP-1-Agonisten Exendin-4 gilt.

Für GLP-1 wurde ausserdem gezeigt, dass es die Sekretion von Amylin stimuliert (Inoue et al., 1991). Diese Tatsache und die Studien von *Rowland et al. (1997)*, die zeigten, dass durch Amylin und GLP-1 ähnliche Hirnareale aktiviert werden, lassen vermuten, dass bei der Wirkungsvermittlung von GLP-1 eine Freisetzung von Amylin und damit ähnliche zentralnervöse Mechanismen beteiligt sein könnten. *Lutz et al. (1994, 1995, 1998a)* konnten zeigen, dass der anorektische Effekt von Amylin nicht durch afferente vagale Nervenfasern vermittelt wird, und schlossen daraus auf eine zentrale Wirkungsvermittlung. Mit subdiaphragmatisch

vagotomierten Ratten untersuchten wir, ob gleiches auch für Exendin-4 gelten könnte. Da bekannt ist, dass die Vermittlung des anorektischen Effekts von Amylin über die Area postrema und das histaminerge System erfolgt (Lutz et al., 1998; Mollet et al., 2001), testeten wir Exendin-4 ebenfalls an AP-X-Ratten und H₁Rko-Mäusen.

6.1.1. Experiment 1: Einfluss von Exendin-4 (20µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 24h gefasteten VAG- und SHAM-Ratten

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00)

24h Futterentzug

HK-Diät

Dieser Versuch wurde mit 15 VAG-Ratten (Ø KGW ca. 440g) durchgeführt, die nach Körpergewicht in 2 Gruppen (n=8 bzw. n=7) eingeteilt wurden, wovon die eine Gruppe Exendin-4 (20 µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Mit den 12 SHAM-Tieren (Ø KGW ca. 490g) wurde gleichermassen verfahren (2 Gruppen zu je n=6). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1, 2 und 12 Stunden gemessen. Der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Exendin-4 reduzierte sowohl bei den VAG- als auch bei den SHAM-Ratten die Futteraufnahme zu jedem Zeitpunkt der Messung signifikant, wobei die VAG-Tiere generell etwas weniger Futter aufnahmen als die SHAM-Ratten. Bezüglich der Exendin-4-Wirkung bestand zwischen den VAG- und den SHAM-Ratten kein signifikanter Unterschied (Abb.1).

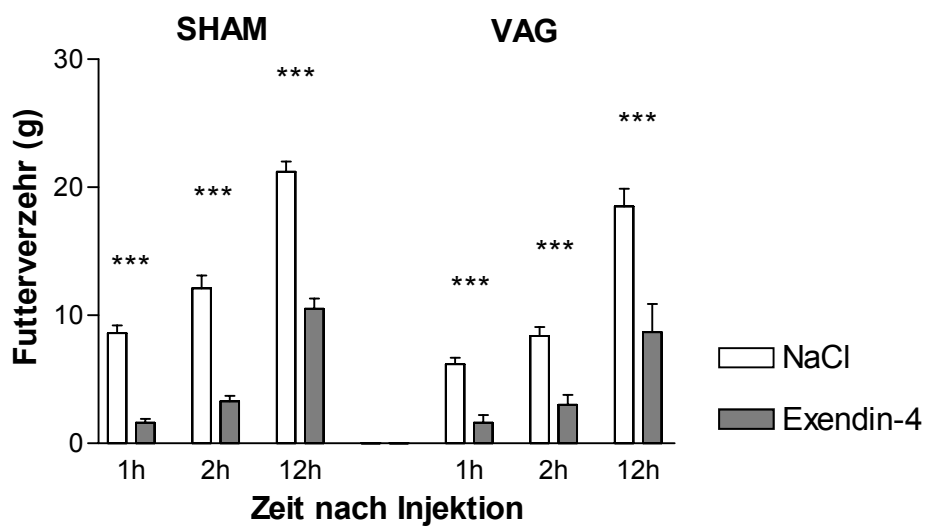


Abb.1: Einfluss von Exendin-4 (20µg/kg, i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von 24h gefasteten VAG- (n=8) und SHAM-Ratten (n=6); NaCl: n=7 (VAG), n=6 (SHAM)
ungepaarter t-Test (***) $p < 0.001$)

6.1.2. Experiment 2: Einfluss von Exendin-4 (2µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 6h gefasteten VAG- und SHAM-Ratten

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00 Uhr)

6h Futterentzug

HK-Diät

Der Versuch wurde mit 13 VAG-Ratten (Ø KGW ca. 440g) durchgeführt, die nach Körpergewicht in 2 Gruppen (n=7 bzw. n=6) eingeteilt wurden. Die eine Gruppe erhielt Exendin-4 i.p. verabreicht, wobei die Dosis im Vergleich zum vorhergehenden Experiment 10-fach reduziert wurde, die andere NaCl als Kontrolle. Das gleiche Verfahren wurde für die 12 SHAM-Tiere (Ø KGW ca. 490g) angewendet (2 Gruppen zu je n=6). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1, 2 und 12 Stunden gemessen. Das Experiment wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test

b) Ergebnisse

Auch bei dieser niedrigeren Dosis reduzierte Exendin-4 sowohl bei den VAG- als auch bei den SHAM-Ratten zu jedem Zeitpunkt der Messung die Futteraufnahme signifikant. Der Futterverzehr der vagotomierten Tiere lag generell unter demjenigen der SHAM-Tiere, aber wiederum war die Wirkungsstärke bei den VAG-Tieren nicht eingeschränkt (Abb.2).

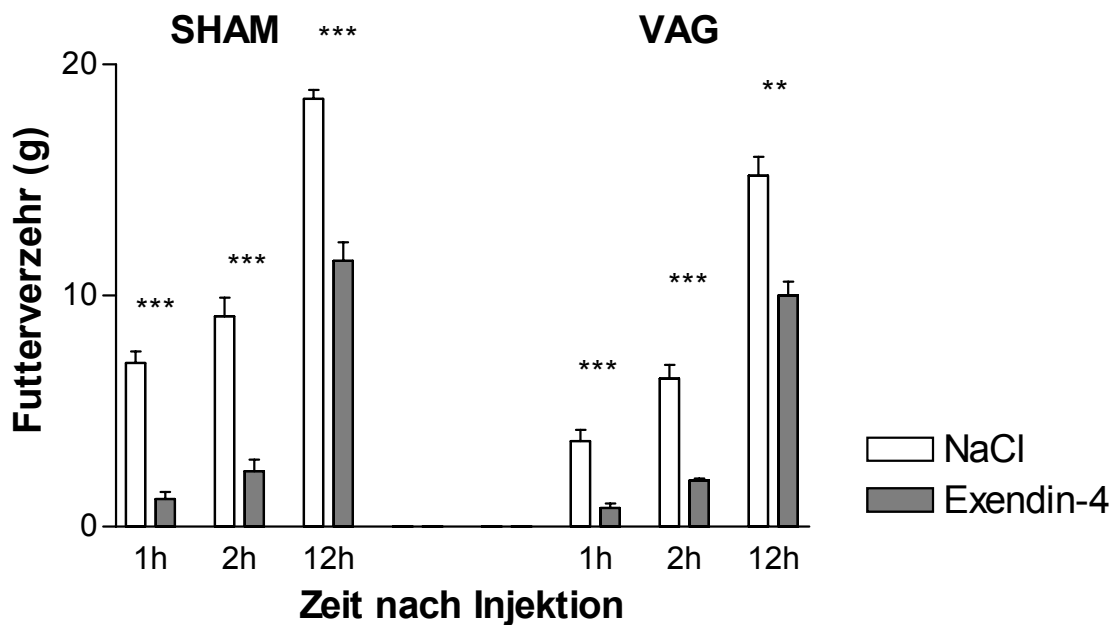


Abb.2: Einfluss von Exendin-4 (2µg/kg, i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von 6h gefasteten VAG- (n=7) und SHAM-Ratten (n=6); NaCl: n=6 für beide Gruppen
ungepaarter t-Test (** p<0.01, *** p<0.001)

6.1.3. Experiment 3: Einfluss von Exendin-4 (10µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten H₁Rko-und Wildtyp-Mäusen

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (9.00)

12h Futterentzug

MF-Diät

Für diesen Versuch wurden 16 H₁Rko-Mäuse (Ø KGW ca. 41g) und 16 Wildtyp-Mäuse (Ø KGW 35g) verwendet, die nach Körpergewicht in jeweils 2 Gruppen eingeteilt wurden (n=8). Die eine Gruppe bekam Exendin-4 (10µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht. Das Injektionsvolumen betrug 10ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1 und 2h gemessen. Der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Exendin-4 hatte in dieser Dosierung weder bei den H₁Rko-Mäusen noch bei den Wildtyp-Mäusen einen signifikanten Einfluss auf die Futteraufnahme. Es führte jedoch bei den H₁Rko-Mäusen tendenziell zu einer Reduktion der Futteraufnahme (Abb.3).

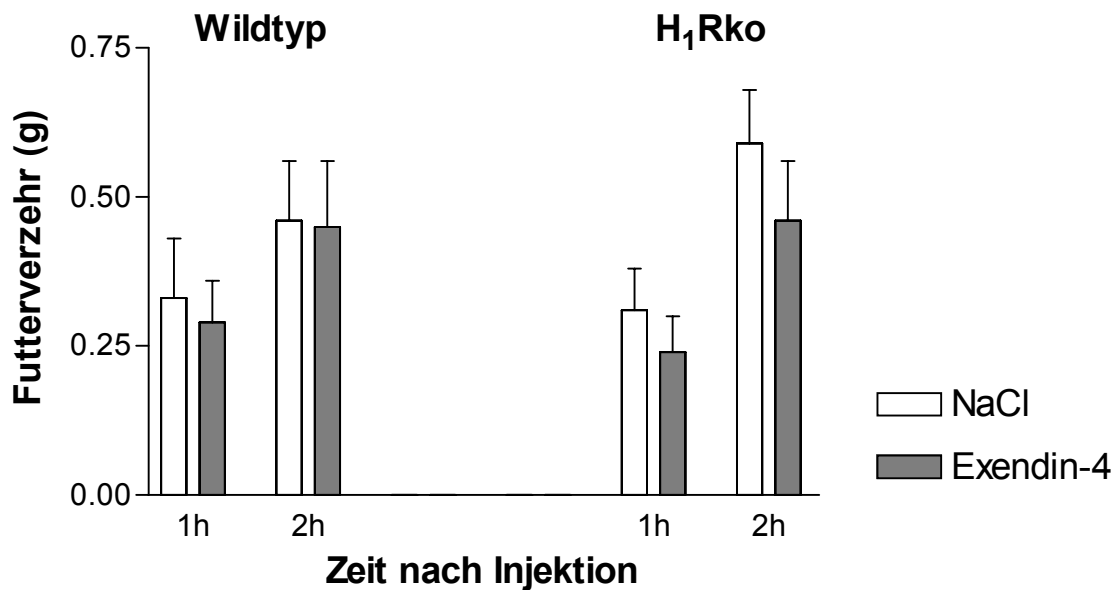


Abb.3: Einfluss von Exendin-4 (10µg/kg) auf den kumulativen Futterverzehr von 12h gefasteten H₁Rko- und Wildtyp-Mäusen
für alle Gruppen n=8; ungepaarter t-Test

6.1.4. Experiment 4: Einfluss von Exendin-4 (20µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten H₁Rko- und Wildtyp-Mäusen

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (9.00)

12h Futterentzug

MF-Diät

Die 16 H₁Rko-Mäuse (Ø KGW ca. 41g) wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewicht in 2 Gruppen eingeteilt (n=8), wovon die eine Gruppe Exendin-4 (20µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Das gleiche Verfahren wurde für die Wildtyp-Mäuse (Ø KGW ca. 34g) angewendet (n=8). Das Injektionsvolumen betrug 10ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme

6.1.5. Experiment 5: Einfluss von Exendin-4 (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten H₁Rko-und Wildtyp-Mäusen

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (9.00)

12h Futterentzug

MF-Diät

Die 16 H₁Rko-Mäuse (Ø KGW ca. 41g) wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewicht in 2 Gruppen eingeteilt (n=8), wovon die eine Gruppe Exendin-4 (100µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Das gleiche Verfahren wurde für die Wildtyp-Mäuse (Ø KGW ca. 34g) angewendet (n=8). Das Injektionsvolumen betrug 10ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1, 2 und 4h gemessen. Der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Exendin-4 reduzierte sowohl bei den H₁Rko-Mäusen als auch bei den Wildtyp-Mäusen die Futteraufnahme zu jedem Messzeitpunkt signifikant. Die Wirkungsstärke von Exendin-4 wurde durch das Fehlen des HA-H₁-Rezeptors nicht beeinflusst (Abb.5).

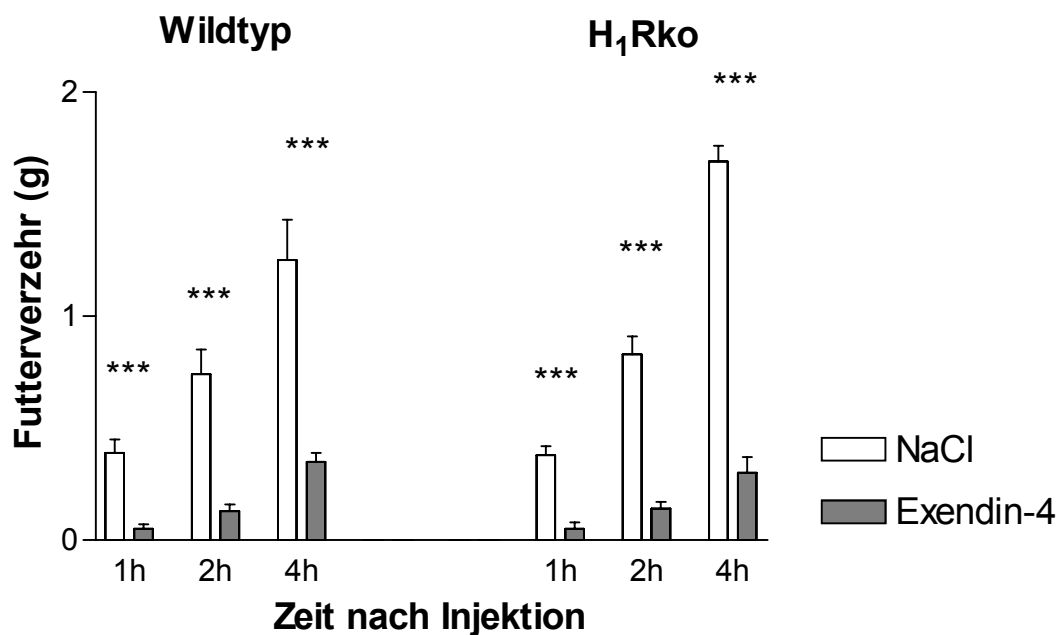


Abb.5: Einfluss von Exendin-4 (100µg/kg, i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von 12h gefasteten H₁Rko- und Wildtyp- Mäusen für alle Gruppen n=8; ungepaarter t-Test (***) p<0.001)

6.1.6. Experiment 6: Einfluss von Amylin (5µg/kg s.c.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten AP-X- und SHAM-Ratten

Der erste Versuch mit den AP-X- und SHAM-Ratten diente als Kontrollexperiment, um zu untersuchen, ob die AP-Läsion richtig gesetzt worden war. Die Dosierung wurde auf 5µg/kg KGW festgesetzt, da von früheren Experimenten (Lutz et al., 1998b) bekannt ist, dass eine einmalige i.p. Injektion dieser Dosis bei SHAM-Tieren anorektisch wirkt, während die AP-Läsion diese Wirkung aufhebt.

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00)

12h Futterentzug

MF-Diät

Die 12 AP-X-Ratten (Ø KGW 359g) wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewichts in 2 Gruppen eingeteilt (n=6), wovon die eine Amylin (5µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Mit den SHAM-Tieren (Ø KGW 412g) wurde auf die gleiche Weise verfahren (n=6). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW und die kumulative Futteraufnahme wurde automatisch vom Computer aufgezeichnet und nach 30min, 1, 2 und 4h ausgewertet. Der Versuch wurde in 2 Durchgängen mit Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten t-Test und einer 2-faktoriellen ANOVA.

b) Ergebnisse

Bei den SHAM-Ratten bewirkte Amylin nach 30min, 1, 2 und 4h eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme, während bei den AP-X-Tieren dies nur nach 2h der Fall war und der Effekt zu den anderen Messzeitpunkten nicht signifikant war (Abb.6). Die 2-faktorielle ANOVA ergab, dass die AP-Läsion die anorektische Wirkung von Amylin nach 4h signifikant abschwächte ($p < 0.05$).

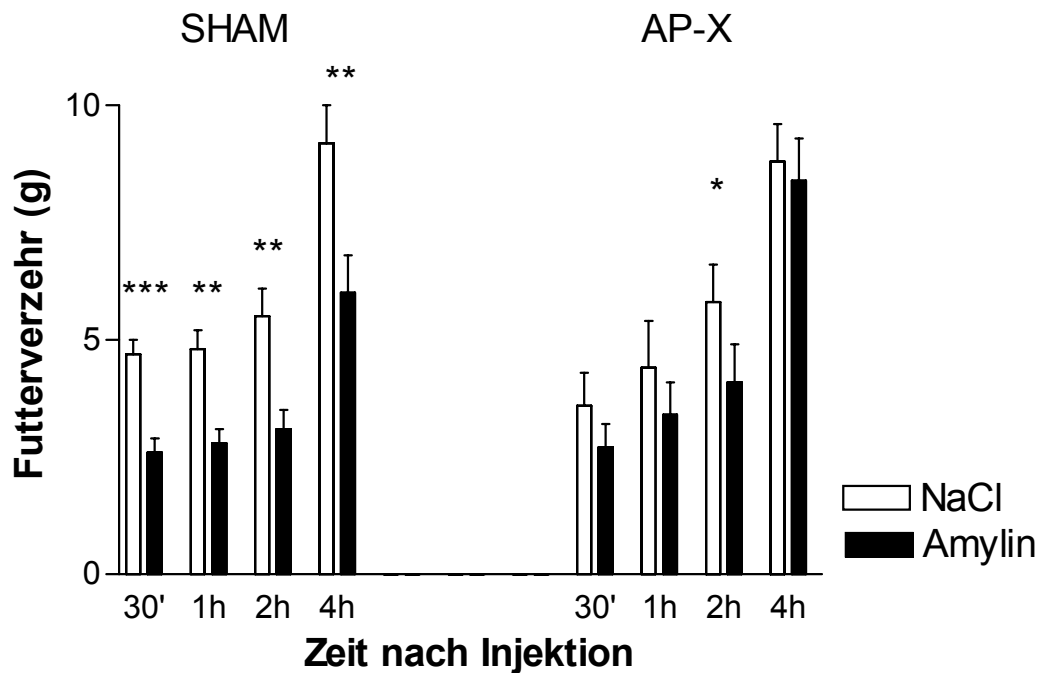


Abb.6: Einfluss von Amylin (5µg/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von 12h gefasteten AP-X- und SHAM-Ratten
für alle Gruppen n=12; gepaarter t-Test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

Das Experiment bestätigt somit die erfolgreiche Durchführung der AP-Läsion bei den AP-X-Ratten.

6.1.7. Experiment 7: Einfluss von Exendin-4 (0.5µg/kg, i.p.) auf die Futteraufnahme von 24h gefasteten AP-X- und SHAM- Ratten

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00)

24h Futterentzug

MF- Diät

Für dieses Experiment dienten 12 AP-X-Ratten (Ø KGW ca. 430g) und 12 SHAM-Tiere (Ø KGW ca. 500g) als Versuchstiere. Sie wurden jeweils unter Berücksichtigung ihres Körpergewicht in 2 Gruppen (n=6) eingeteilt, wovon die eine Gruppe Exendin-4 (0.5µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1 und 2h gemessen. Der Versuch wurde in 2 Durchgängen mit Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Exendin-4 reduzierte sowohl bei den AP-X- als auch bei den SHAM- Ratten die Futteraufnahme zu beiden Messzeitpunkten signifikant. Die AP-X-Tiere zeigten zwar gegenüber den SHAM-Ratten einen allgemein leicht reduzierten Futterverzehr, wogegen die Wirksamkeit von Exendin-4 bei beiden Gruppen gleich war (Abb.7).

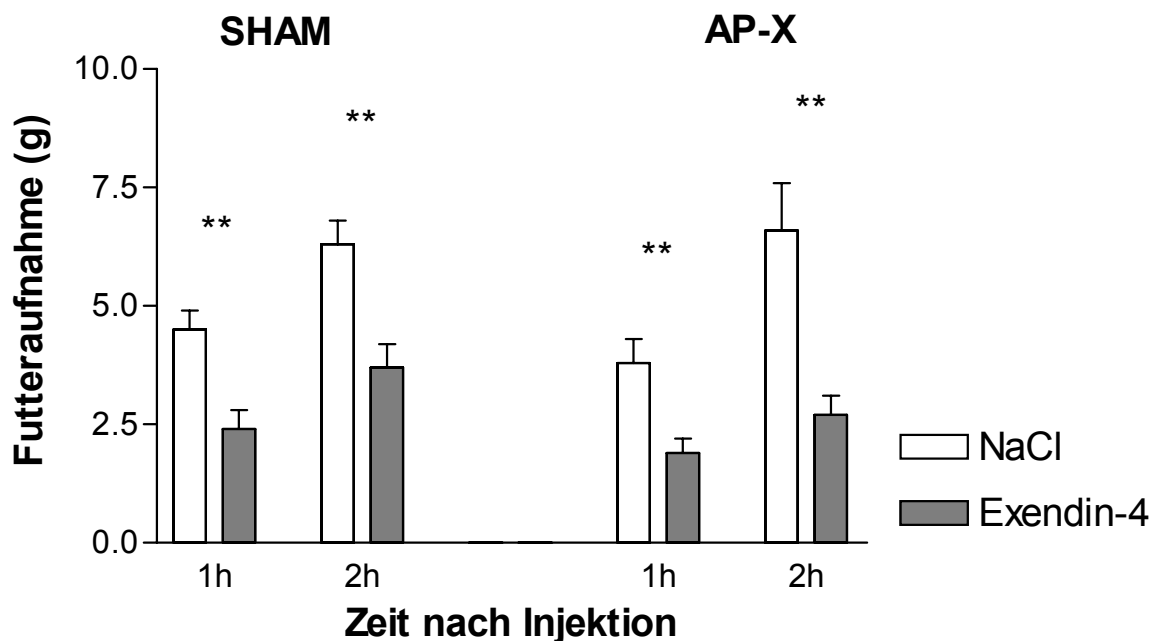


Abb.7: Einfluss von Exendin (0.5µg/kg, i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von 24h gefasteten AP-X- und SHAM- Ratten
für alle Gruppen n=12; gepaarter t-Test (** p<0.01)

6.1.8. Experiment 8: Einfluss von Exendin-4 (2µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von 24h gefasteten AP-X- und SHAM- Ratten

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00)

24h Futterentzug

MF- Diät

Die 12 AP-X-Ratten (Ø KGW ca. 450g) wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewicht in 2 Gruppen (n=6) eingeteilt, wovon die eine Gruppe Exendin-4 (2.0µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Das gleiche Verfahren wurde für die SHAM- Tiere (Ø KGW ca. 500g) angewendet (n=6). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1 und 2h gemessen. Der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Exendin-4 führte auch in dieser Dosierung sowohl bei den AP-X- als auch bei den SHAM- Ratten zu einer signifikanten Reduktion der Futteraufnahme nach 1 und 2h, wobei der Effekt bei den AP-X-Tieren geringgradig schwächer ausfiel (Abb.8).

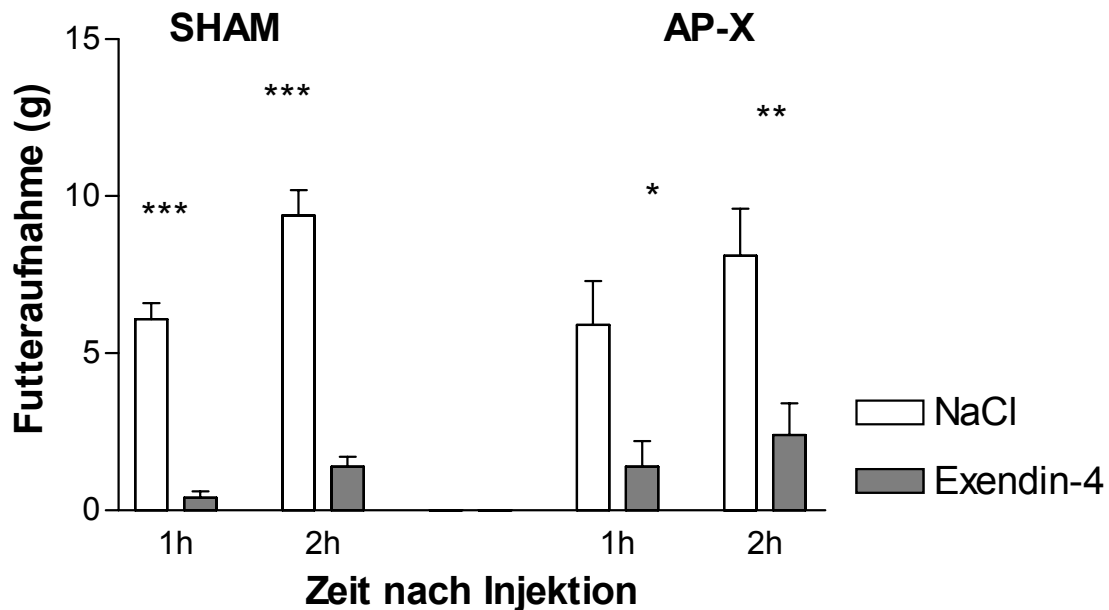


Abb.8: Einfluss von Exendin-4 (2 μ g/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von 24h gefasteten AP-X- und SHAM- Ratten
für alle Gruppen n=6; ungepaarter t-Test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

6.1.9. Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente 1-8

Bei den VAG- und SHAM- Ratten führte sowohl die i.p. Injektion von 20 als auch von 2 μ g/kg KGW Exendin-4 zu einer langandauernden, signifikanten Reduktion der Futteraufnahme, wobei der Effekt durch die Vagotomie nicht beeinflusst wurde. Auch eine AP- Läsion hob den Effekt von Exendin-4 weder bei einer Dosierung von 0.5 noch von 2 μ g/kg KGW auf. Bei den H₁Rko-Mäusen erwies sich eine Dosis von 10 μ g/kg KGW Exendin-4 als zu niedrig, um das Verzehrsverhalten signifikant zu beeinflussen. Zumindest war bei den knock-out-Mäusen auch bei dieser Dosierung eine Tendenz in Richtung Verzehrsreduktion ersichtlich. Bei höheren Dosierungen von 20 bzw. 100 μ g/kg KGW zeigten sowohl Wildtyp- als auch H₁Rko- Mäuse eine signifikante Verzehrsreduktion, wobei diese vom Fehlen des Histamin-H₁-Rezeptors unbeeinflusst blieb.

Die Vermutung, Exendin-4 könnte über eine Freisetzung von Amylin und damit über ähnliche zentralnervöse Mechanismen verzehrsreduzierend wirken wie dieses, zeigt sich durch unsere Versuche nicht bestätigt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass, im Gegensatz zu Amylin, weder die Area postrema noch das histaminerge System eine bedeutende Rolle spielen. Es scheint jedoch, dass auch der Sättigungseffekt von Exendin-4 nicht über afferente, vagale Nervenfasern, sondern zentral vermittelt wird.

6.2. Experiment 9: Untersuchung zur Auslösung einer Geschmacksaversion durch Exendin-4

a) Durchführung (siehe auch 3.8.)

Die Ratten wurden unter Berücksichtigung ihres KGW (Ø KGW 264g) in 4 Gruppen eingeteilt (n=8). Während des ganzen Versuches stand den Tieren eine MF-Diät ad libitum zur Verfügung. Am Konditionierungstag wurde den Tieren zu Beginn der Hellphase (6.00) das Wasser entzogen. 3 Stunden vor Beginn der Dunkelphase (15.00) erhielt jedes Tier wieder 2 Flaschen mit einer 0.1% Saccharinlösung. Nach 2 Stunden (17.00) wurden die Tiere mit den folgenden Substanzen injiziert:

Gruppe 1:	Kontrolle:	NaCl
Gruppe 2:	Negativkontrolle:	Amylin (20µg/kg KGW)
Gruppe 3:	Positivkontrolle:	LiCl (50mg/kg KGW)
Gruppe 4 :	Testsubstanz:	Exendin-4 (2µg/kg KGW)

Das Injektionsvolumen betrug für jede Gruppe 1ml/kg KGW.

Nach den Injektionen wurden die Flaschen mit der Saccharinlösung entfernt und jedem Tier wieder 2 Flaschen mit Wasser angeboten. 72 und 96h nach Applikation der Testsubstanzen (Konditionierung) fand die eigentliche Prüfung auf eine allfällige Geschmacksaversion statt, indem jedem Tier jeweils zu Beginn der Dunkelphase (18.00) eine Flasche mit Wasser und eine Flasche mit 0.1% Saccharinlösung für 12 Stunden angeboten wurde. Die aufgenommenen Flüssigkeitsmengen wurden durch Wiegen der Trinkflaschen gemessen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einer ANOVA für einfache Messungen mit einem Folgetest nach Student-Newman-Keuls.

b) Ergebnisse

Bei der Kontrollgruppe (NaCl) und den Amylin-injizierten Tieren war eine starke Präferenz für die Saccharin-Lösung festzustellen, die gegenüber Wasser sowohl nach 72 als auch 96h signifikant war (Abb.9). Dabei unterschied sich die Menge

Saccharinlösung, die von der NaCl-Gruppe getrunken wurde, nicht signifikant von derjenigen, welche die Amylin-Gruppe aufnahm (Tab.1). Hingegen vermochte die Applikation von LiCl und Exendin-4 diese Präferenz abzuschwächen: Der Unterschied zwischen der aufgenommenen Wasser- und Saccharinmenge war bei diesen Gruppen deutlich weniger ausgeprägt als bei der NaCl- und Amylin-Gruppe (Tab.2). Amylin beeinflusst die Präferenz für Saccharinlösung demzufolge nicht, während LiCl und Exendin-4 zu einer Aufhebung derselben führten.

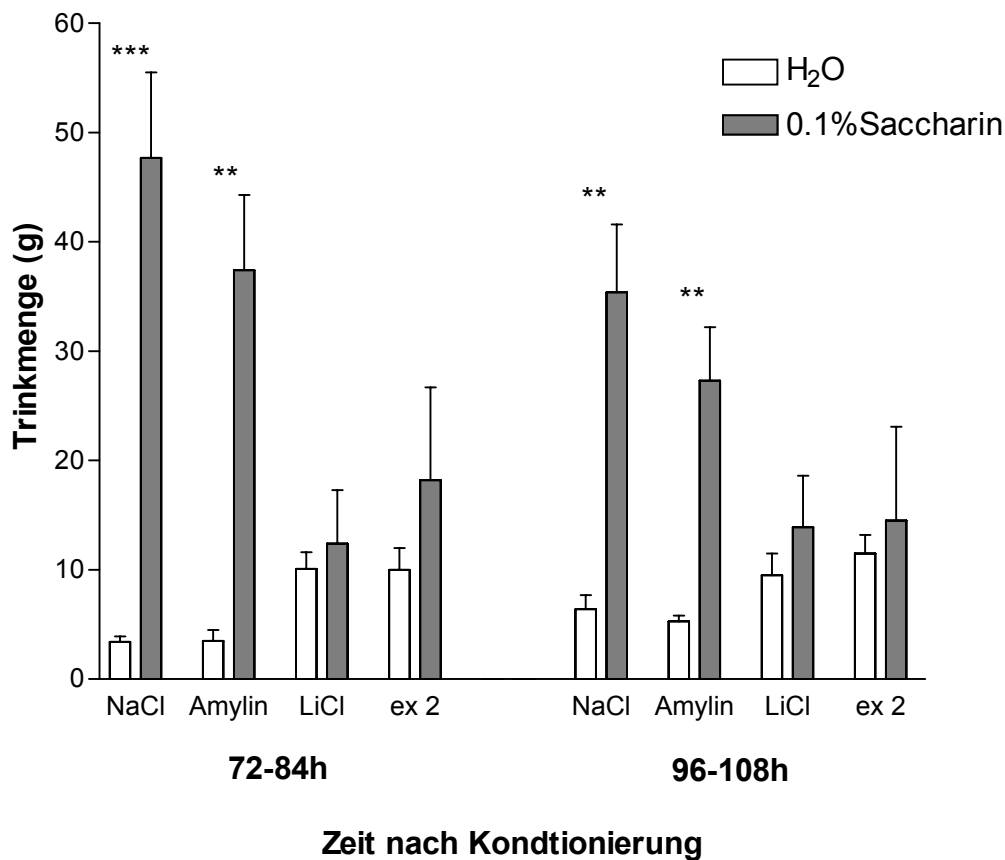


Abb.9: Einfluss von Exendin-4 (2µg/kg), Amylin (20µg/kg) und LiCl (50mg/kg) auf die Präferenz von 0.1% Saccharin-Lösung gegenüber Trinkwasser 72 bzw. 96h nach der Konditionierung
für alle Gruppen n=8; gepaarter t-Test (** p<0.01, *** p<0.001)

	Flüssigkeitsmengen in ml			
	72-84h		96-108h	
	H ₂ O	0.1% Saccharin-Lösung	H ₂ O	0.1% Saccharin-Lösung
NaCl	3.4±0.5	47.7±7.8	6.4±1.3	35.4±6.2
Amylin	3.5±1.0	37.4±6.9	5.3±0.5	27.3±4.9
LiCl	10.1±2.0	12.4±4.9	9.5±2.0	13.9±4.7
Exendin 2µg	10.0±2.0	18.2±8.5	11.5±1.7	14.5±8.6
p	<0.01	<0.01	n.s.	n.s.

Tab.1: Einfluss von Exendin-4 (2µg/kg), Amylin (20µg/kg) und LiCl (50mg/kg) auf die 12h-Flüssigkeitsaufnahme von Trinkwasser bzw. 0.1% Saccharinlösung 72 bzw. 96h nach Konditionierung für alle Gruppen n=8; einfache Varianzanalyse mit Folgetest nach Student-Newman-Keuls

	Saccharinkonsum in % der totalen Flüssigkeitsaufnahme	
	72-84h	96-108h
NaCl	93.3	84.6
Amylin	91.4	83.7
LiCl	55.1	59.4
Exendin-4	64.5	55.8

Tab.2: Saccharinkonsum in % der totalen Flüssigkeitsaufnahme

6.3. Untersuchungen zum Einfluss von Ghrelin auf das Verzehrsverhalten von Ratten

Kojima et al. (1999), Date et al. (2000) und Seoane et al. (2000) zeigten, dass das erst seit kurzem bekannte Hormon Ghrelin die Ausschüttung von Somatotropin stimuliert. Seine verzehrssteigernde Wirkung wurde durch Experimente am Menschen bekannt, die nach Ghrelininjektion ein Hungergefühl beschrieben (Arvat et al., 2000). Durch die gesteigerte Nahrungsaufnahme und die damit erzeugte positive Energiebilanz soll die anabole Wirkung des Wachstumshormons maximiert werden (Tschöp et al., 2000). Um eine eventuell besondere Funktion von Ghrelin hinsichtlich der Verzehrsregulation im Wachstum abzuklären, verglichen wir seine Wirkung auf den Futterverzehr bei jungen und älteren adulten Ratten (Def.: siehe Kap. 5.1). Zudem klärten wir mit AP-X- und SHAM-Ratten ab, ob bei der Vermittlung des verzehrssteigernden Effekts die Area postrema beteiligt ist.

Shintani et al. (2001) zeigten, dass Ghrelin den verzehrsreduzierenden Effekt von Leptin aufheben und somit als dessen funktioneller Antagonist verstanden werden kann. Wir interessierten uns deshalb auch bei Leptin für eine allfällige Beteiligung der Area postrema an der Wirkungsvermittlung (Kap. 4.4.)

6.3.1. Experiment 10: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, jungen adulten Ratten

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00)

Fütterung ad libitum

MF- Diät

Als Versuchstiere dienten für diesen Versuch 24 Wistar-Ratten (Ø KGW ca. 92g), die, entsprechend ihrem Körpergewicht, in 2 Gruppen eingeteilt wurden (n=12).

Die eine Gruppe erhielt i.p. eine Ghrelininjektion (100µg/kg), die andere diente als Kontrolle (NaCl). Das Injektionsvolumen betrug 10ml/kg KGW und der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt. Die kumulative Futterraufnahme wurde automatisch durch den Computer aufgezeichnet und die Daten nach 30min, 1, 2, 4, 10, 12h ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Ghrelin führte in dieser Dosierung zu jedem Messzeitpunkt zu einer tendenziellen Erhöhung der Futterraufnahme, das Signifikanzniveau wurde jedoch nie erreicht (Abb.10).

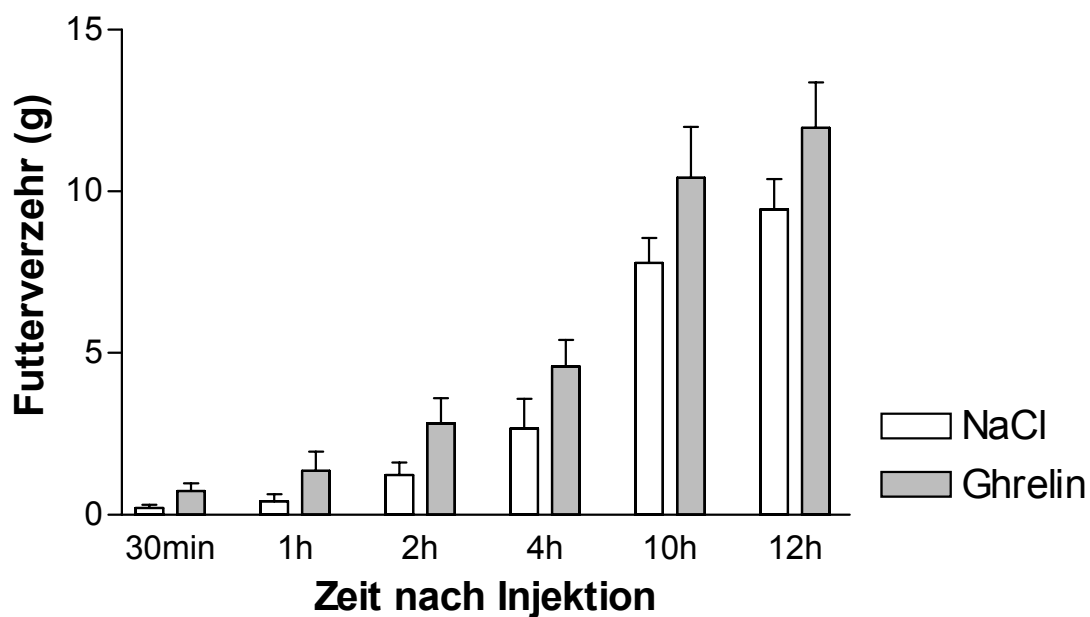


Abb.10: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg , i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten jungen adulten Ratten für beide Gruppen n=12; ungepaarter t-Test

6.3.2. Experiment 11: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von 12h gefasteten, jungen adulten Ratten

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00)

12h Futterentzug

MF-Diät

Die 24 Ratten (Ø KGW ca. 158g) wurden wiederum unter Berücksichtigung ihres Körpergewichts in 2 Gruppen eingeteilt (n=12) und diesmal 12h gefastet. Die eine Gruppe erhielt Ghrelin (100µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht. Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt. Die kumulative Futteraufnahme wurde automatisch durch den Computer aufgezeichnet und die Daten nach 30min, 1, 2, 4, 10 und 12h ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Ghrelin bewirkte unter diesen Versuchsbedingungen keine Veränderung in Bezug auf die kumulative Futteraufnahme (Abb.11).

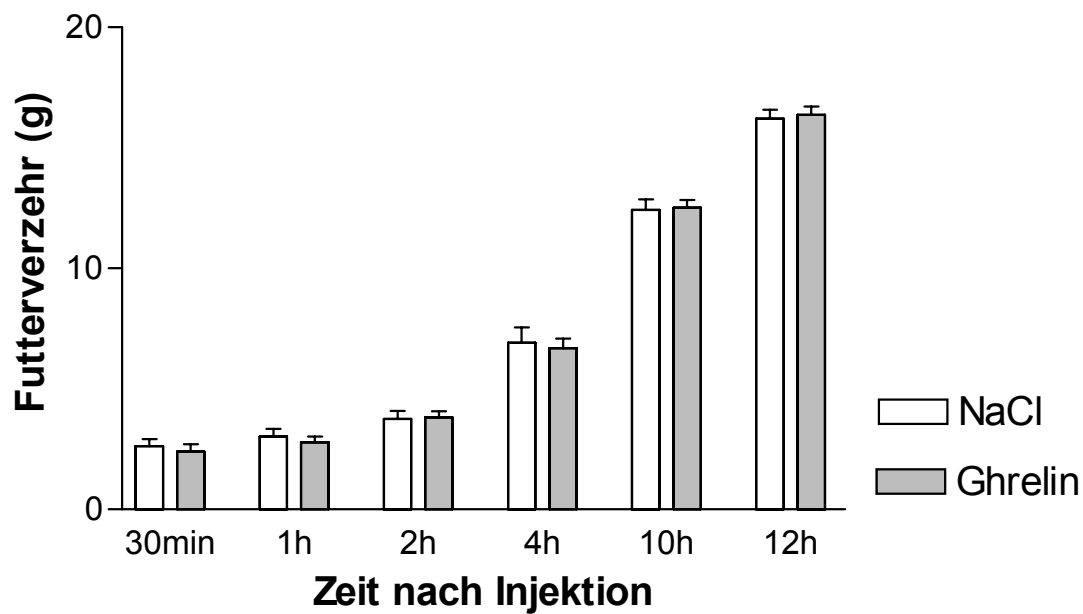


Abb.11: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von 12h gefasteten jungen adulten Ratten für beiden Gruppen n=12; ungepaarter t-Test

6.3.3. Experiment 12: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, jungen adulten Ratten

a) Durchführung

Injektion **Mitte HP** (12.00)

Fütterung *ad libitum*

MF- Diät

Die Gruppeneinteilung der 24 Tiere in 2 Gruppen erfolgte wieder nach Körpergewicht (Ø KGW ca. 130g; n=12). Diesmal erfolgte die Injektion in der Mitte der Hellphase, d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem der Futterverzehr vor allem von jungen Ratten normalerweise sehr gering ist. Die eine Gruppe erhielt i.p. eine Ghrelininjektion (100µg/kg), die andere diente als Kontrolle (NaCl). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt. Die kumulative Futteraufnahme

wurde automatisch durch den Computer aufgezeichnet und die Daten nach 30min, 1, 2 und 4h ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Ghrelin bewirkte nach 30min, 1h und 2h einen signifikanten Anstieg der verzehrten Futtermenge. Nach 4h war die Steigerung des Futtermittels noch tendenziell feststellbar (Abb.12)

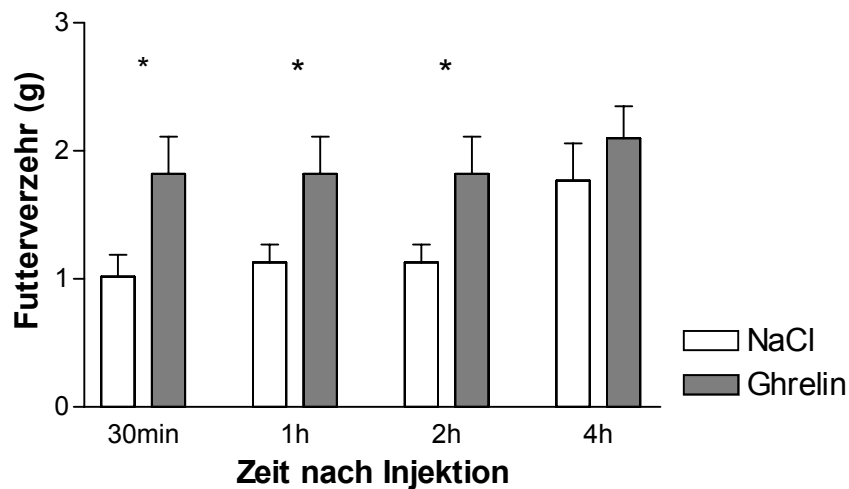


Abb.12: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf den kumulativen Futtermittelverzehr von ad libitum gefütterten jungen adulten Ratten für beide Gruppen n=12; ungepaarter t-Test (* p<0.05)

6.3.4. Experiment 13: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, jungen adulten Ratten

a) Durchführung

Injektion Mitte HP (12.00)

Fütterung ad libitum

MF- Diät

Zur Verifikation der Daten aus Versuch 12 wurde der Versuch unter den gleichen Bedingungen, aber mit einer neuen Charge von Tieren wiederholt. Die 20 Tiere

wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewichts (\bar{X} KGW ca. 132g) in 2 Gruppen eingeteilt (n=10). Die Durchführung entsprach dem vorhergehenden Versuch. Die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1, 2 und 4h gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Bereits nach einer Stunde führte Ghrelin zu einem tendenziellen Anstieg der aufgenommenen Futtermenge, welcher nach 2h das Signifikanzniveau erreichte (Abb.13).

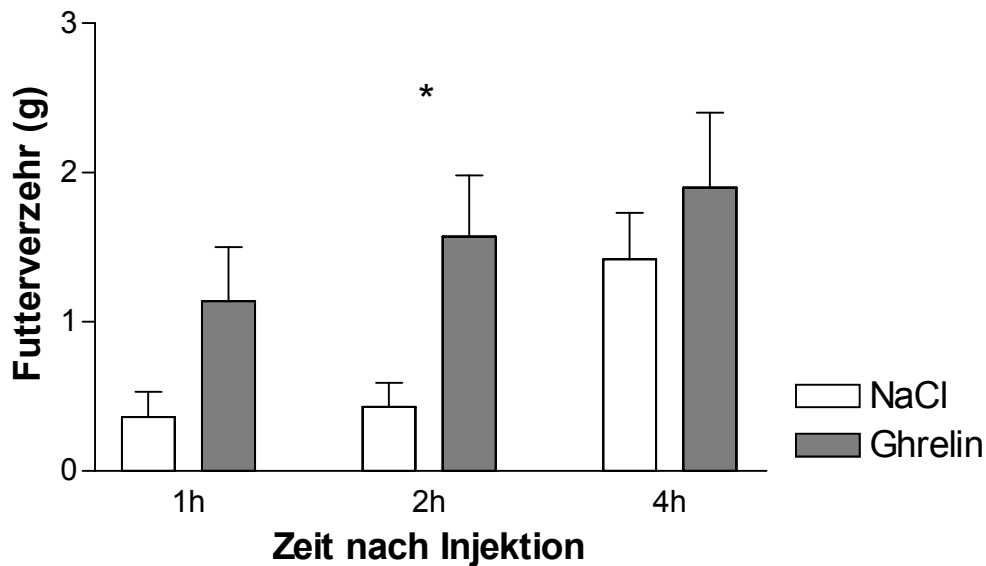


Abb.13: Einfluss von Ghrelin (100 μ g/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten jungen adulten Ratten für beide Gruppen n=10; ungepaarter t-Test (* p<0.05)

6.3.5. Experiment 14: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, adulten Ratten

a) Durchführung

Injektion Mitte HP (12.00)

Fütterung ad libitum

MF- Diät

Für dieses Experiment wurden die gleichen 24 Ratten verwendet wie für die Experimente 10, 11 und 12. Das Durchschnittsgewicht pro Tier betrug nun aber 373g. Sie wurden wiederum nach KGW in 2 Gruppen eingeteilt (n=12). Die eine Gruppe erhielt i.p. eine Ghrelininjektion (100µg/kg), die andere diente als Kontrolle (NaCl). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt. Die kumulative Futteraufnahme wurde automatisch durch den Computer aufgezeichnet und die Daten nach 30min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 18h ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

b) Ergebnisse

Ghrelin beeinflusste unter diesen Versuchsbedingungen bei adulten Ratten die Futteraufnahme nicht (Abb.14).

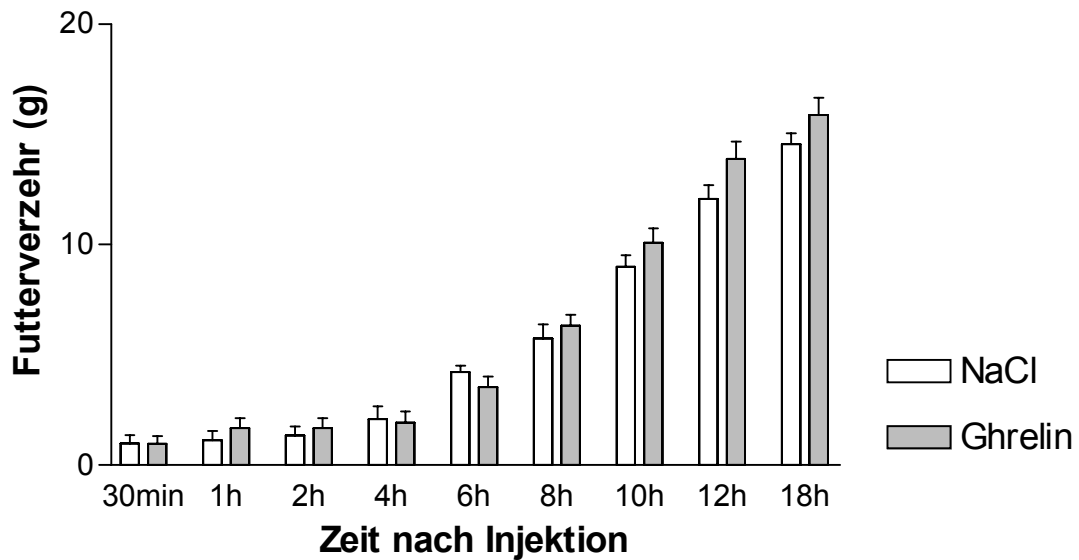


Abb.14: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten, adulten Ratten
für beide Gruppen n=12; ungepaarter t-Test

6.3.6. Experiment 15: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, adulten AP-X- und SHAM-Ratten

a) Durchführung

Injektion in der frühen HP (8.30)

Fütterung ad libitum

MF-Diät

In Anlehnung an die Versuche, die *Wren et al. (2001)* mit adulten Ratten (250-300g) durchführte, legten wir diesmal den Injektionszeitpunkt ebenfalls in die frühe Hellphase (2.5h nach Beginn der HP).

Die 12 AP-X-Ratten (Ø KGW 343g) wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewichts in 2 Gruppen eingeteilt (n=6), wovon die eine Ghrelin (100µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Mit den SHAM-Tieren (Ø KGW 397g) wurde auf die gleiche Weise verfahren (n=6). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme wurde automatisch vom Computer aufgezeichnet und die Daten nach 30min, 1, 2, 4, 10, 12 und 24h ausgewertet. Der Versuch wurde in 2 Durchgängen mit Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten t-Test und einer 2-faktoriellen ANOVA.

b) Ergebnisse

Bei den SHAM-Tieren bewirkte Ghrelin nach 30min und 1h eine tendenzielle Steigerung der Futteraufnahme, die nach 2h das Signifikanzniveau erreichte. Bei den AP-X-Ratten war eine ebenfalls signifikante Erhöhung des Futtermittels, allerdings erst nach 12 und 24h feststellbar (Abb.15). Die 2-faktorielle ANOVA ergab, dass die Läsion der AP keinen signifikanten Einfluss auf die Steigerung der Futteraufnahme durch Ghrelin hatte ($p > 0.05$).

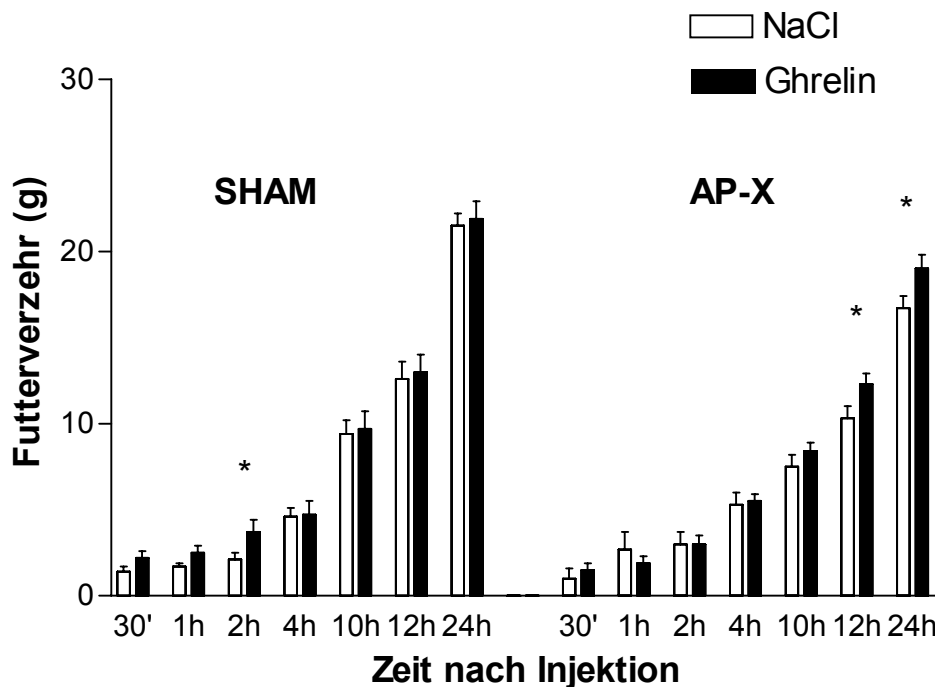


Abb.15: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die kumulative Futteraufnahme von ad libitum gefütterten AP-X- und SHAM-Ratten für alle Gruppen $n=12$; gepaarter t-Test (* $p < 0.05$)

6.3.7. Experiment 16: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten, adulten AP-X-und SHAM-Ratten

a) Durchführung

Injektion Mitte HP (12.00)

Fütterung ad libitum

MF-Diät

Die 12 AP-X-Tiere (Ø KGW 430g) wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewichts in 2 Gruppen (n=6) eingeteilt. Die eine Gruppe erhielt eine Ghrelininjektion (100µg/kg), die andere NaCl i.p. Das gleiche Verfahren wurde für die SHAM-Ratten (Ø KGW 487g) angewendet (2 Gruppen zu n=6). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 1, 2 und 4h gemessen. Der Versuch wurde in 2 Durchgängen mit Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten t-Test und einer 2-faktoriellen ANOVA.

b) Ergebnisse

Ghrelin führte bei den AP-X-Tieren nach 2h zu einer signifikanten Steigerung des Futtermittelfressens, während es bei den SHAM-Ratten zu keinem Messzeitpunkt einen Einfluss auf das Fressverhalten hatte (Abb.16). Die 2-faktorielle ANOVA ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der gesteigerten Futteraufnahme durch Ghrelin und der AP-Läsion ($p>0.05$).

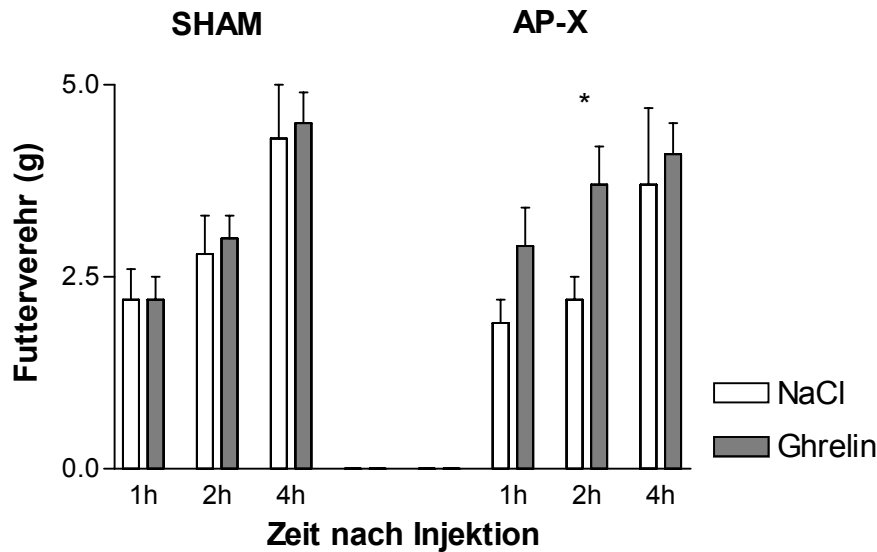


Abb.16: Einfluss von Ghrelin (100µg/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten AP-X- und SHAM-Ratten für alle Gruppen n=12; gepaarter t-Test (* p<0.05)

6.3.8. Experiment 17: Einfluss einer wiederholten Ghrelinapplikation (15µg/kg/Tag; über 10 Tage) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten, adulten AP-X- und SHAM-Ratten

a) Durchführung

Injektion 1 x täglich zu Beginn HP (8:30)

ad libitum Fütterung

MF-Diät

Der Versuch wurde mit 12 AP-X und 12 SHAM-Ratten durchgeführt, welche wiederum entsprechend ihrem Körpergewicht in je 2 Gruppen eingeteilt wurden (Ø KGW: SHAM: 461g; AP-X: 403g). Die eine Gruppe erhielt jeweils einmal täglich eine Ghrelininjektion (15µg/kg i.p.), die andere NaCl als Kontrolle. Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt. Die kumulative Futteraufnahme wurde automatisch vom Computer aufgezeichnet. Die Daten wurden täglich ausgewertet und zudem der durchschnittliche Futterverzehr pro Tier und Tag

berechnet (Abb.17). Dieser wurde für jede Gruppe über die ganze Versuchsdauer aufaddiert (Abb.18 und 19).

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test und einer 2-faktoriellen ANOVA.

b) Ergebnisse

Der durchschnittliche, tägliche Futterverzehr war ab dem 2. Tag jeweils für die Gruppe der ghrelinbehandelten SHAM-Tiere am grössten, während die anderen Gruppen deutlich weniger frassen und sich nicht wesentlich voneinander unterschieden (Abb.17). Am 4., 5. und 7. Versuchstag unterschied sich der durchschnittliche, tägliche Futterverzehr der ghrelininjizierten SHAM-Tiere signifikant gegenüber ihren Kontrollen.

Wurde zudem die durchschnittliche, tägliche Verzehrsmenge für jede Gruppe über die gesamte Versuchsdauer kumulativ addiert, war bei den SHAM-Tieren ein signifikanter Unterschied zwischen der ghrelinbehandelten Gruppe und deren Kontrollen festzustellen: Für die Summe ab dem Tag 7 ergab sich eine signifikante Steigerung des Futterverzehrs durch Ghrelin (Abb.18). Bei den AP-X-Tieren war dieser Effekt nicht feststellbar (Abb.19).

Gemäss einer 2-faktoriellen ANOVA war der ausbleibende Effekt von Ghrelin bei den AP-X-Tieren statistisch allerdings nicht gesichert auf die AP-Läsion zurückzuführen ($p > 0.05$).

Während bei den SHAM-Tieren beide Gruppen signifikant an Gewicht zulegten, war dies bei den AP-X-Ratten nur bei den ghrelinbehandelten Tieren der Fall. Der tendenziell stärkere Gewichtszuwachs bei den ghrelinbehandelten Tieren schien durch die AP-Läsion nicht abgeschwächt zu werden (Tab.3).

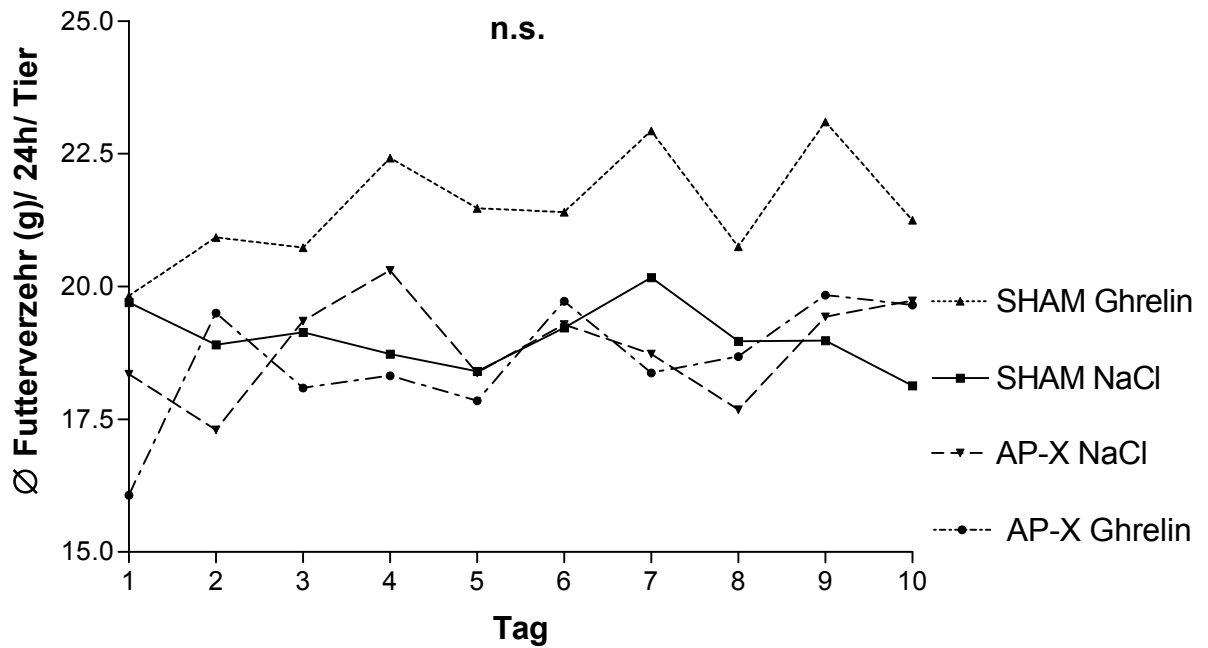


Abb.17: Einfluss einer täglichen Ghrelininjektion (15µg/kg i.p.; 10 Tage) auf den durchschnittlichen, täglichen Futterverzehr von AP-X- und SHAM-Ratten

für alle Gruppen n=6; einfache Varianzanalyse mit Folgetest nach Student-Newman-Keuls für alle 10 Tage ($p > 0.05$)

Ø KGW in Gramm				
	SHAM NaCl	SHAM Ghrelin	AP-X NaCl	AP-X Ghrelin
Versuchsbeginn	459.8±14.8	461.2±11.9	403.3±12.0	402.0±13.0
Versuchsende	466.8±16.0	477.8±12.3	409.5±16.0	416.0±13.8
p	<0.05	<0.01	n.s.	<0.01

Tab.3 Einfluss einer täglichen Ghrelininjektion (15µg/kg i.p.; 10 Tage) auf die Körpergewichtszunahme von AP-X- und SHAM-Ratten

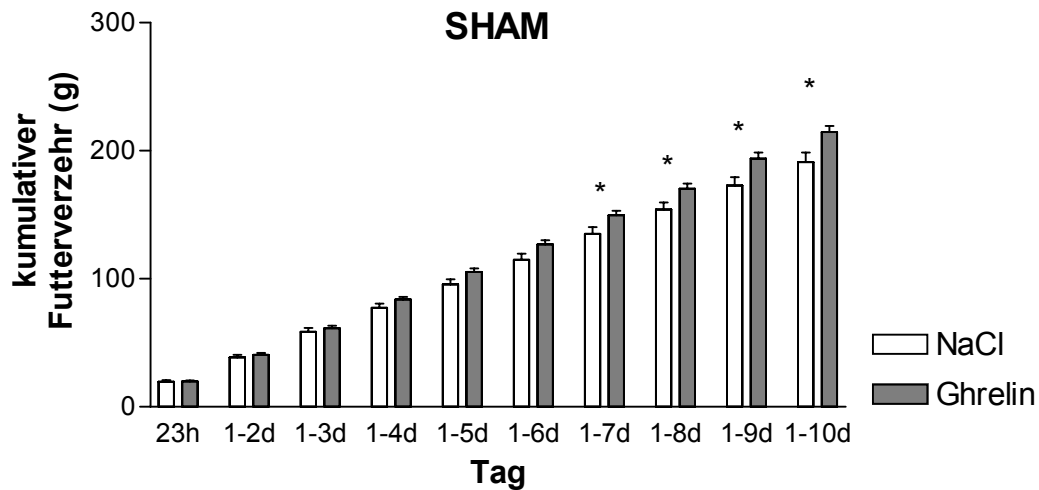


Abb.18: Kumulative Addition der täglich verzehrten durchschnittlichen Futtermenge von ghrelininjizierten (15µg/kg i.p.) SHAM-Ratten bzw. deren Kontrollen
für alle Gruppen n=6; ungepaarter t-Test (* p<0.05)

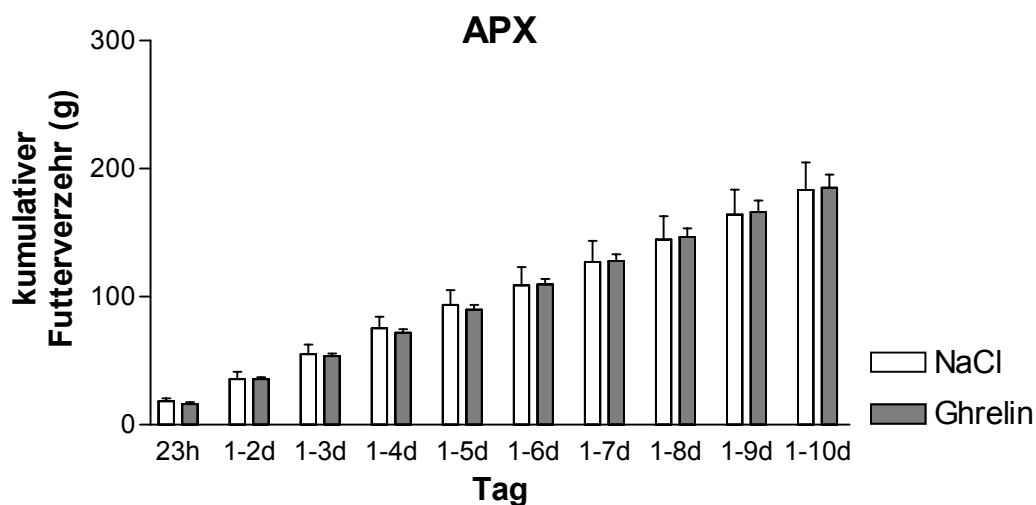


Abb.19: Kumulative Addition der täglich verzehrten durchschnittlichen Futtermenge von ghrelininjizierten (15µg/kg i.p.) AP-X-Ratten bzw. deren Kontrollen
für alle Gruppen n=6; ungepaarter t-Test

6.3.9. Zusammenfassung der Experimente 10-17

Als verzehrssteigerndes Hormon blieb eine Dosis von 100µg/kg Ghrelin bei jungen adulten Ratten, sowohl mit als auch ohne Futterentzug, bei einer Applikation zu Beginn der Dunkelphase ohne Wirkung. Bei den gleichen Tieren wirkte jedoch die Mitte der Hellphase injizierte identische Dosis verzehrssteigernd. Adulte Ratten zeigten hingegen unter den gleichen Versuchsbedingungen keine erhöhte Futteraufnahme unter Ghrelineinfluss.

Versuche zur Abklärung einer Beteiligung der Area postrema an der Wirkungsvermittlung von Ghrelin lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Während in Versuch 15 die SHAM-Tiere einen kurzzeitigen Effekt zeigten (nach 2h), welcher bei den AP-X-Ratten ausblieb, war in Versuch 16 das Gegenteil der Fall, indem die AP-X-Tiere nach 2h eine deutliche Verzehrssteigerung zeigten, welche bei den SHAM-Tieren fehlte. Ein Langzeitversuch mit AP-X- und SHAM-Ratten, bei dem die Tiere über 10 Tage täglich eine Dosis von 15µg/kg Ghrelin i.p. erhielten, ergab bei der Gruppe der ghrelininjizierten SHAM-Tiere einen gegenüber den anderen Gruppen gesteigerten Futterverzehr pro Tier und Tag. Die von einem Tier täglich gefressene Futtermenge aufaddiert über die gesamte Versuchsdauer ergab ab dem Tag 7 jeweils eine signifikant erhöhte Futtermenge bei den ghrelinbehandelten SHAM-Ratten im Vergleich zu ihren Kontrollen. Bei den AP-X-Ratten war dieser Effekt nicht feststellbar. Allerdings waren die betreffenden Effekte sehr wenig ausgeprägt, so dass ihre physiologische Relevanz unklar ist.

6.4. Untersuchungen zum Einfluss von Leptin auf das Verzehrsverhalten von Ratten

6.4.1. Experiment 18: Einfluss von Leptin (600µg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten AP-X- und SHAM-Ratten

a) Durchführung

Injektion zu Beginn DP (18.00)

Fütterung ad libitum

MF-Diät

Die 12 AP-X-Ratten wurden ihrem Körpergewicht entsprechend (Ø KGW 449g) in 2 Gruppen (n=6) eingeteilt, wovon die eine Leptin (600µg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Mit den 12 SHAM Tieren (Ø KGW 508g) wurde gleichermassen verfahren (2 Gruppen zu n=6). Das Injektionsvolumen betrug 1ml/kg KGW, und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 6, 12 und 24h gemessen. Der Versuch wurde in 2 Durchgängen mit Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten t-Test.

c) Ergebnisse

In dieser Dosierung wirkte Leptin weder bei den SHAM- noch bei den AP-X-Tieren anorektisch (Abb.20).

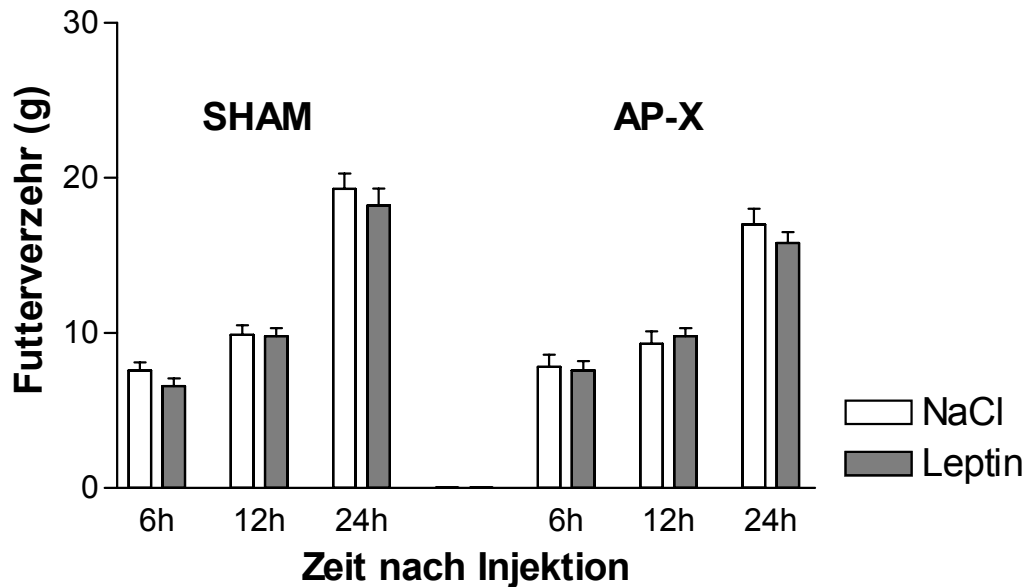


Abb.20: Einfluss von Leptin (600µg/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten AP-X- und SHAM-Ratten für alle Gruppen n=12; gepaarter t-Test

6.4.2. Experiment 19: Einfluss von Leptin (1.2mg/kg i.p.) auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten AP-X- und SHAM-Ratten

Die 12 AP-X-Ratten wurden ihrem Körpergewicht entsprechend (Ø KGW 459g) in 2 Gruppen (n=6) eingeteilt, wovon die eine Leptin (1.2mg/kg) und die andere NaCl als Kontrolle i.p. verabreicht bekam. Mit den 12 SHAM Tieren (Ø KGW 521g) wurde gleichermassen verfahren (2 Gruppen zu n=6). Das Injektionsvolumen betrug 2ml/kg KGW und die kumulative Futteraufnahme wurde nach 6, 12 und 24h gemessen. Der Versuch wurde in einem Durchgang ohne Gruppentausch durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test und einer 2-faktoriellen ANOVA.

c) Ergebnisse

Bei einer Dosierung von 1.2mg/kg KGW führte Leptin bei den SHAM-Tieren nach 6 und 12h zu einer signifikanten, nach 24h noch zu einer tendenziellen Reduktion der Futteraufnahme. Bei den AP-X-Ratten war die verminderte Futteraufnahme durch Leptin zwar tendenziell angedeutet, zu keinem der drei Messzeitpunkte jedoch signifikant (Abb.21). Wie die 2-faktorielle ANOVA zeigte, bestand allerdings kein Zusammenhang zwischen der AP-Läsion und der Leptin-Wirkung.

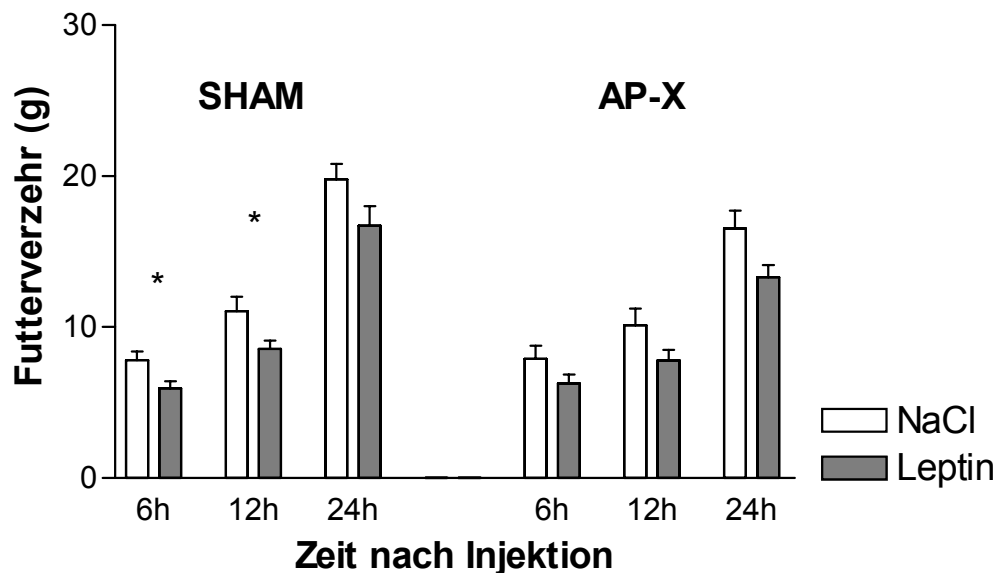


Abb.21: Einfluss von Leptin (1.2mg/kg i.p.) auf den kumulativen Futterverzehr von ad libitum gefütterten, adulten SHAM-und AP-X-Ratten für alle Gruppen n=6; ungepaarter t-Test (* p<0.05)

6.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse 18 und 19

Bei einer Dosierung von 600µg/kg KGW beeinflusste Leptin die Futteraufnahme nicht. Bei einer doppelt so hohen Dosierung konnte sowohl bei den AP-X- als auch bei den SHAM-Ratten eine über 24h anhaltende Verzehrsdepression beobachtet werden, die jedoch nur bei den SHAM-Tieren signifikant ausfiel (6 und 12h). Die AP-Läsion beeinflusste die Leptinwirkung dabei nicht.

7. Diskussion

7.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

a) Exendin-4

- Die anorektische Wirkung des langwirksamen GLP-1-Agonisten Exendin-4 wird nicht über die gleichen Mechanismen wie der Effekt von Amylin vermittelt: Eine AP-Läsion und das Fehlen des Histamin-H₁-Rezeptors konnten den anorektischen Effekt von Exendin-4 nicht aufheben.
- Exendin-4 löst eine erlernte Geschmacksaversion aus.

b) Ghrelin

- Der verzehrssteigernde Effekt von Ghrelin scheint altersabhängig zu sein. Bei adulten Ratten konnte nach peripherer Verabreichung keine Steigerung der Futteraufnahme beobachtet werden, während dies unter entsprechenden Bedingungen bei jungen adulten Ratten der Fall war.

d) Leptin

- Eine Läsion der Area postrema hebt die anorektische Wirkung von peripherem Leptin nicht auf.

7.2. Bedeutung von Area postrema, Nervus vagus und histaminergem System für die Wirkungsvermittlung von Exendin-4

Unsere Versuche mit H₁Rko-Mäusen, AP-X- und vagotomierten Ratten dienten der Abklärung der Wirkungsvermittlung des langwirksamen GLP-1-Agonisten Exendin-4. Speziell interessierte uns dabei die Frage, ob GLP-1 bzw. Exendin-4 seine anorektische Wirkung über die gleichen Mechanismen vermittelt wie Amylin.

Sowohl Exendin-4 als auch Amylin sind bekannt für ihre starke anorektische Wirkung (Szayna et al., 2000; Edwards et al., 2001; Lutz et al., 1994; Lutz et al., 1995). Zudem werden durch GLP-1 bzw. Exendin-4 und Amylin ähnliche Hirnareale (AP, NTS, Amygdala) aktiviert, wie anhand des immunhistochemischen Nachweises von c-Fos gezeigt wurde (Rowland et al., 1997; Lutz et al., 2002). GLP-1 stimuliert ausserdem auch die Freisetzung von Insulin und Amylin (Mojsov et al., 1987; Inoue et al., 1991; Holz et al., 1993, Lu et al., 1993), und von Exendin-4 ist bekannt, dass es ebenfalls die Insulin- Sekretion erhöht (Göke et al., 1993). Die Frage stellte sich daher auch, ob die anorektische Wirkung von Exendin-4 über die Freisetzung von Amylin und damit über ähnliche zentralnervöse Mechanismen vermittelt wird.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine subdiaphragmatische Vagotomie den verzehrsreduzierenden Effekt von Amylin nicht aufzuheben vermag, was auf eine zentral vermittelte Wirkung schliessen lässt (Lutz et al., 1995). Ausserdem scheinen bei der Vermittlung des anorektischen Effekts von Amylin die Area postrema (Lutz et al., 1998b) und das histaminerge System (Mollet et al., 2001) eine wichtige Rolle zu spielen. Unsere Versuche zeigten nun, dass Exendin-4 die Futteraufnahme über andere Mechanismen senkt als Amylin, obwohl durch Exendin-4 ähnliche Hirnareale aktiviert werden (Lutz et al., 2002). Weder eine Läsion der AP noch das Fehlen des Histamin-H₁-Rezeptors hoben den anorektischen Effekt von peripher appliziertem Exendin-4 auf. Dagegen beeinflusste wie bei Amylin eine subdiaphragmatische Vagotomie die Wirkung von Exendin-4 nicht, was ebenfalls auf einen direkten ZNS-Effekt hindeutet.

Histamin ist bekannt als Neurotransmitter, dem auch eine wichtige Funktion bei der Regulation der Nahrungsaufnahme zukommt (Mercer et al., 1994; Sakata et al., 1997). Frühere Studien belegten das Vorkommen von Histamin-Rezeptoren im ventromedialen Hypothalamus und im Nucleus paraventricularis, beides wichtige Regionen für die Erhaltung des Energiegleichgewichts (Sakata et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass der Gehalt an Histamin im ZNS die Futteraufnahme über den Histamin-H₁-Rezeptor beeinflusst, wobei ein Anstieg der Histamin-Konzentration zu einer Hemmung des Futtermessens führt, während ein Absinken derselben oder eine Blockade der Histamin-H₁-Rezeptoren zu einer Verzehrsteigerung führt (Fukagawa et al., 1989; Mercer et al., 1994). Bekannt ist ebenfalls, dass über das histaminerge System die anorektische Wirkung von

Amylin vermittelt wird (Mollet, 2001). Unsere Versuchsergebnisse zeigen nun demgegenüber, dass das histaminerge System keine zentrale Rolle in der Vermittlung des anorektischen Effekts von Exendin-4 spielt. Bei den H₁Rko-Mäusen führte nämlich sowohl eine Dosis von 20µg/kg als auch von 100µg/kg zu einem signifikanten Futterverzehrsrückgang.

Die Versuchsergebnisse mit den VAG-Ratten deuten darauf hin, dass ähnlich wie bei Amylin (Lutz et al., 1995) auch Exendin-4 einen direkten zentralen Effekt hat. Im Gegensatz zu Amylin (Lutz et al., 1998b) scheint allerdings die AP für den anorektischen Effekt von Exendin-4 keine bedeutende Rolle zu spielen.

Von GLP-1 ist bekannt, dass ein wichtiger Ort der zentralen Wirkungsvermittlung der Nucleus arcuatus (ARC) ist. *Tang-Christensen et al. (1998)* führten Versuche mit Ratten durch, die mit Mono-Natrium-Glutamat (MSG)-behandelt worden waren, welches Neurone des ARC zerstört. Diese Versuche zeigten, dass nach einer Zerstörung des ARC der verzehrsreduzierende Effekt von GLP-1 aufgehoben ist. *Tang-Christensen et al. (1998)* postulierten, dass GLP-1 auf inhibitorische Neurone des ARC wirkt, die zu entfernteren hypothalamischen Neuronen projizieren, wo sie mit Neuronen interagieren, welche den orexigenen Effekt von NPY vermitteln.

Göke et al. (1995) zeigten, dass das Verteilungsmuster der Bindungsstellen für GLP-1 und Exendin-4 im ZNS identisch ist. Es ist daher anzunehmen, dass obige Ausführungen bezüglich der zentralnervösen Mechanismen auch für Exendin-4 gelten. Entsprechende Versuche existieren diesbezüglich allerdings noch nicht.

7.3. Ist der anorektische Effekt von Exendin-4 auf eine Geschmacksaversion zurückzuführen?

Bezüglich der Spezifität der anorektischen Wirkung von GLP-1 ist einschränkend festzustellen, dass GLP-1 auch eine Geschmacksaversion (CTA) auslösen kann (Thiele et al., 1997; van Dijk et al., 1997; Wang et al., 1998). Ob das gleiche auch für Exendin-4 gilt, war das Ziel unseres CTA-Versuches.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verzehrsreduzierende Wirkung von Exendin-4 zumindest zum Teil durch eine erlernte Geschmacksaversion zustande kommt. Während bei den NaCl- und den Amylin- behandelten Tieren sowohl 72h als auch 96h nach der Konditionierung eine klare Präferenz für die Saccharin-

Lösung bestehen blieb, war diese bei den Exendin-4-injizierten Tieren deutlich reduziert. Diese Ergebnisse bestätigen somit bezüglich der Amylinwirkung die Ergebnisse von Szabady (1995), welche für Amylin in einem ähnlichen Versuch keine erlernte Geschmacksaversion ergaben (siehe auch Lutz et al., 1995). Demgegenüber löst peripher appliziertes Exendin-4 eine CTA aus und kann deshalb nicht als reines Sättigungspeptid angesehen werden.

Für GLP-1 wurde bezüglich der Vermittlung von Sättigung einerseits und der Auslösung einer CTA andererseits über ein sogenanntes unidimensionales System spekuliert, wonach die beiden unterschiedlichen Effekte über dieselben zentralnervösen Mechanismen vermittelt werden sollten. Demnach sollte die GLP-1-Konzentration dafür ausschlaggebend sein, welche der beiden Wirkungen eintritt, wobei GLP-1 in hohen Dosierungen eine CTA, in niedrigeren Dosierungen hingegen spezifisch Sättigung bewirken sollte (Rowland et al., 1997). Dieser Theorie widerspricht hingegen die Tatsache, dass ICV appliziertes GLP-1 in allen Dosierungen, welche den Futterverzehr reduzieren, auch eine CTA auslöste (Thiele et al., 1997; van Dijk et al., 1997), während Infusionen von GLP-1 in den PVN in Dosierungen, welche keine CTA bewirkten, ausschliesslich den Futterverzehr reduzierten (McMahon et al., 1998). Van Dijk et al. (1999) konnten zudem mit Läsionsstudien zeigen, dass Ratten ohne intakten PVN nach ICV-Applikation von GLP-1 zwar eine starke CTA entwickelten, aber keinen kurzfristigen Verzehrsrückgang mehr zeigten, während eine Zerstörung des zentralen Nucleus der Amygdala (ceA) darin resultierte, dass die Tiere mit einer kurzfristigen Verzehrdepression, nicht aber mit einer CTA reagierten. Van Dijk et al. (1999) stellten deshalb für die Wirkungsvermittlung von GLP-1 die These auf, wonach GLP-1 über zwei unabhängige Wege Sättigung und CTA auslöst. So soll der PVN die Anorexie, der CeA hingegen die CTA vermitteln.

Eine wichtige Funktion bezüglich des Erlernens einer CTA wird auch der AP zugeschrieben (van Dijk et al., 1999). Wir konnten nun zeigen, dass Exendin-4 zwar eine CTA auslösen kann, dass die verzehrsreduzierende Wirkung jedoch bei AP-X-Ratten bestehen bleibt. Dies deutet darauf hin, dass zumindest die verzehrsreduzierenden Effekte von Exendin-4 nicht durch die AP vermittelt werden. Es wäre deshalb interessant, in einem CTA-Versuch an AP-X-Ratten abzuklären, wie diese Tiere auf Exendin-4 reagieren.

7.4. Altersabhängige Wirkung von Ghrelin auf das Verzehrsverhalten von Ratten und die Beteiligung der AP

Unsere Versuche mit jungen und älteren adulten Ratten stehen mit der von *Tschöp et al. (2000)* aufgestellten Hypothese im Einklang, Ghrelin erzeuge durch seinen verzehrssteigernden Effekt eine positive Energiebilanz, welche die Wirkung von GH maximiert. So konnten wir in unseren Experimenten wiederholt nachweisen, dass eine bestimmte Dosis peripher verabreichten Ghrelins bei jungen adulten Tieren zwar zu einem akut verzehrssteigernden Effekt führt, unter den gleichen Versuchsbedingungen aber nicht bei den älteren Ratten. Auch bei den jungen Ratten in einer Phase intensiven Wachstums war dieser Effekt jedoch von den Versuchsbedingungen abhängig. So blieb bei ihnen ein verzehrssteigernder Effekt aus, wenn Ghrelin zu Beginn der Dunkelperiode (mit oder ohne Futterentzug) appliziert wurde. Dies könnte mit der circadianen Schwankung des Ghrelin-Plasmaspiegels erklärt werden. *Shiia et al. (2002)* erstellten beim Menschen ein 24h Profil von zirkulierendem Ghrelin und erhielten ein Muster, welches einen Anstieg der Ghrelin-Konzentration vor einer Mahlzeit zeigt und einen Abfall derselben nach der Nahrungsaufnahme. Auch bei Ratten konnte gezeigt werden, dass nach einer Fastenperiode die Ghrelin-Konzentration im Blut ansteigt, um bei anschliessender Fütterung wieder auf Normalwerte abzufallen (*Tschöp et al., 2000, Toshinai et al., 2001*). So könnte bei Ratten zu Beginn der Dunkelperiode vorallem nach einem Futterentzug ein relativ hoher Ghrelin-Plasmaspiegel dafür sorgen, dass zusätzlich peripher appliziertes Ghrelin keine weitere Wirkung hervorrufen kann. Zu Beginn der Hellperiode hingegen (relativ tiefe Ghrelin-Plasma-Werte) scheint die Ansprechbarkeit auf Ghrelin besser zu sein, und ausserdem lässt sich ein Anstieg der verzehrten Futtermenge in der anschliessenden Hellperiode, wenn der Futterverzehr prinzipiell gering ist, besser feststellen.

Bisher wurde ein verzehrssteigernder Effekt nach peripher verabreichtem Ghrelin bei älteren adulten Ratten (250-350g) nur von *Wren et al. (2001)* und *Date et al. (2002)* beobachtet. Wir konnten dies in unserer Versuchsreihe allerdings nicht nachvollziehen. Hingegen wurde derselbe Effekt bei ebenfalls ausgewachsenen Ratten mehrmals nach ICV Infusion von Ghrelin beschrieben (*Asakawa et al., 2001, Nakazato et al., 2001, Shintani et al., 2001*). Eine relativ kurze

Halbwertszeit mag als Erklärung dafür dienen, dass nach peripherer Applikation von Ghrelin eine Hyperphagie nicht unter allen Bedingungen beobachtet werden kann (Tschöp et al., 2000). Eine zentrale Verabreichung resultiert allerdings in einer höheren lokalen Ghrelin-Konzentration an den Rezeptoren im ZNS. Trotzdem lässt die starke verzehrssteigernde Reaktion nach ICV Infusion von Ghrelin eine zentral vermittelte Wirkung vermuten. Ob die Wirkungsvermittlung überhaupt durch zirkulierendes Ghrelin direkt im ZNS erfolgt, wird jedoch durch neueste Studien in Frage gestellt. *Date et al. (2002)* zeigten nämlich, dass bei Ratten, die einer Vagotomie respektive einer Capsaicin-Behandlung (spezifisches Neurotoxin für afferente Nervenfasern) unterzogen wurden, sowohl die durch Ghrelin ausgelöste Verzehrssteigerung als auch die Aktivierung der NPY-produzierenden Neurone im ARC ausblieb. *Date et al. (2002)* postulierten deshalb, dass die Wirkung von Ghrelin nicht direkt zentral, sondern über gastrische vagale Afferenzen vermittelt wird.

Ungeachtet der Tatsache, ob Ghrelin direkt (siehe später) oder über gastrische vagale Afferenzen indirekt auf das ZNS wirkt, scheint der hypothalamische ARC eine wichtige Rolle einzunehmen. *Hewson et al. (2000)* wiesen mittels c-Fos-Studien eine Aktivierung des Nucleus arcuatus durch peripher verabreichtes Ghrelin nach. *Nakazato et al. (2001)* beschrieben dies allerdings auch für andere für die Regulation der Futteraufnahme wichtige Hirnareale. *Lawrence et al. (2002)* beobachteten schliesslich mit der gleichen Methode auch eine ghrelininduzierte Aktivierung der Area postrema, in der zudem GHS-Rezeptoren nachgewiesen wurden (Yokote et al., 1998; Lawrence et al., 2002).

Unsere Experimente mit AP-X-Ratten sollten nun im Fütterungsversuch eine mögliche Beteiligung der Area postrema an der Vermittlung der verzehrssteigernden Wirkung peripher verabreichten Ghrelins abklären. Die Resultate sind allerdings uneinheitlich und zum Teil widersprüchlich und sollen im folgenden erklärt werden.

Experiment 15 und 16 wurden unter fast identischen Versuchsbedingungen (Injektion in der frühen Hellphase resp. Mitte Hellphase, ad libitum Fütterung) und mit den gleichen Ratten durchgeführt. Während in Versuch 15 Ghrelin bei den AP-X-Ratten erst nach 12 und 24h zu einer Verzehrssteigerung führte und ein kurzfristiger Effekt ausblieb, konnte ein solcher in Experiment 16 deutlich beobachtet werden. Die SHAM-Tiere reagierten jedoch nur in Versuch 15 mit

einer kurzfristigen Verzehrssteigerung nach 2h. Prinzipiell scheint damit die AP trotz des Vorkommens von GHS-Rezeptoren in dieser Gehirnregion bezüglich der Wirkungsvermittlung von Ghrelin nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da ein verzehrssteigernder Effekt auch bei Ratten mit einer AP-Läsion beobachtet werden konnte. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von *Lawrence et al. (2002)*, welche zwar eine Aktivierung der AP durch Ghrelin belegen, diese aber im Vergleich mit jener des Nucleus arcuatus als relativ schwach bezeichnen. Zudem scheint Ghrelin seine verzehrssteigernde Wirkung nicht nur zentral zu vermitteln. Nach *Date et al. (2002)* scheint nämlich eine wichtige Bedeutung der Signalübermittlung durch gastrische vagale Afferenzen zu zukommen. Warum hingegen Ghrelin bei den AP-X-Ratten im akuten Versuch generell besser wirkte als bei den SHAM-Tieren ist unklar. Aufgrund der geringgradigen Effekte von Ghrelin bei adulten Ratten, ist die biologische Relevanz dieser Beobachtungen momentan noch unklar.

Ein anderes Bild zeichnete nämlich der Versuch mit chronischer Applikation von Ghrelin bei denselben Ratten (15µg/kg/Tag über 10 Tage). Die kumulative Addition des Tagesfutterverzehrs über 10 Tage ergab bei den ghrelinbehandelten SHAM-Tieren eine signifikante Steigerung des Verzehrs ab dem 7. Versuchstag gegenüber ihren Kontrollen. Bei den AP-X-Ratten war diesbezüglich kein Unterschied feststellbar. In einem ähnlichen Langzeitversuch von *Wren et al. (2001)* mit normalen adulten Ratten zeigte sich eine signifikante Stimulation der täglichen Futteraufnahme bei ghrelinbehandelten Ratten, und zwar für den 24h-Wert jedes einzelnen Tages. Diese Resultate lassen darauf schliessen, dass die durch Ghrelin ausgelöste Körpergewichtszunahme durch eine Hyperphagie ausgelöst wird. Widerprüchlich bleibt die Tatsache, dass in akuten Versuchen die AP-Läsion die Ghrelinwirkung nicht zu beeinträchtigen schien, während im Langzeitversuch das Gegenteil der Fall war. Denkbar wäre, dass bei einer einmaligen, relativ hoch dosierten Ghrelinapplikation die AP bei der Wirkungsvermittlung nur eine untergeordnete Rolle spielt, und vorwiegend andere Mechanismen aktiv sind, dass aber bei einer kleinen, chronisch verabreichten Dosis die AP ebenfalls an der Wirkungsvermittlung beteiligt ist.

Anders als die orexigen wirkenden hypothalamischen Peptide NPY und AGRP, welche zwar verzehrssteigernd wirken, wenn sie zentral appliziert werden, nicht aber bei peripherer Verabreichung, kann peripheres Ghrelin die Futteraufnahme

steigern (Inui, 2001). Es wurde vermutet, dass die Octanoyl-Gruppe des dritten Serinrests das Peptid dazu befähigt, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Wren et al., 2000). Der Nucleus arcuatus ist mit seiner Lokalisation an der Basis des Hypothalamus, beidseits des dritten Ventrikels, ein optimaler Ort für die Kommunikation mit peripheren Signalen, zumal an dieser Stelle die Blut-Hirn-Schranke nur schwach ausgebildet ist (Kalra et al., 1999; Inui, 2001). *Hewson et al. (2000)* konnten zeigen, dass eine systemische Applikation von Ghrelin zu einer starken Aktivierung von Neuronen des ARC führt. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass im ARC ein ausgeprägtes Vorkommen an GHS-R-mRNA beschrieben wurde (Guan et al., 1997). GHS-R mRNA wird zudem im ARC in 94% der NPY-exprimierenden Neuronen gefunden (Willesen et al., 1999), was mit den Studien von *Shintani et al. (2001)* im Einklang steht, die eine Erhöhung der hypothalamischen NPY-mRNA nach Ghrelininjektion beschreiben. Zudem wurde von *Shintani et al. (2001)* ebenfalls nachgewiesen, dass NPY Y1-Rezeptor-Antagonisten den verzehrssteigernden Effekt von Ghrelin aufheben. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Wirkungsvermittlung im ARC unter Beteiligung des NPY-Systems erfolgt.

NPY-produzierende Neurone werden vorallem im ventromedialen ARC (ArcM) gefunden, während im ventrolateralen ARC (ArcL) vorallem Proopiomelanocortin (POMC)-Neurone dominieren, die das anorektische Peptid α -MSH produzieren (Broberger et al., 1997). Die elektrophysiologischen Studien von *Riediger et al. (im Druck)* zeigen einen direkten exzitatorischen Effekt von Ghrelin auf eine hohe Zahl von Neuronen des ArcM. *Riediger et al. (im Druck)* spekulierte, dass diese NPY-exprimierenden, ghrelinaktivierten Zellen des ArcM einerseits zu orexigenen Zellen des Nucleus paraventricularis projizieren, andererseits auch zu POMC-Neuronen des ArcL, welche durch die Ghrelin-stimulierte NPY-Freisetzung gehemmt werden.

Eine grosse Anzahl dieser durch Ghrelin aktivierten Neurone im ArcM exprimieren zudem den Leptinrezeptor (Traebert et al., 2002). Dies lässt eine hypothalamische Interaktion dieser beiden Hormone vermuten, welche *Traebert et al. (2002)* mit elektrophysiologischen Studien belegen konnten. Demnach aktiviert Ghrelin im ArcM die Mehrheit der Neurone, welche durch Leptin eine Hemmung erfahren (Traebert et al., 2002). Der antagonistische Effekt von Leptin und Ghrelin auf die Neurone des ArcM stehen im Einklang mit ihrer gegensätzlichen

Wirkung auf die Nahrungsaufnahme. In Fütterungsversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die Leptin-induzierte Hemmung der Futteraufnahme und die dabei beobachtete Reduktion hypothalamischer NPY-mRNA durch eine gleichzeitige ICV-Infusion von Ghrelin aufgehoben wird (Shintani et al., 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das orexigen wirksame Hormon Ghrelin als direkter Gegenspieler von Leptin verstanden werden kann, wobei es seine Wirkung vor allem im ArcM unter Beteiligung des NPY-Systems zu entfalten scheint. Die Area postrema scheint hingegen bei der Vermittlung des orexigenen Effekts von Ghrelin keine bedeutende Rolle zu spielen.

Der anorektische Effekt von Leptin scheint im Wesentlichen ebenfalls nicht durch die AP vermittelt zu werden. In unseren Versuchen mit AP-X-Ratten war die Reduktion des Futterverzehrs durch peripher appliziertes Leptin statistisch zwar nicht signifikant, jedoch noch deutlich erkennbar. Obwohl Leptin-Rezeptoren in der AP gefunden wurden (Mercer et al., 1998; Lin et al., 2000), scheint auch bei Leptin die Effektvermittlung vor allem durch den ARC zu erfolgen. So konnte *Traebert et al. (2002)* in elektrophysiologischen Studien nachweisen, dass die Mehrheit der Neurone des ArcM durch Leptin gehemmt wird und vermuteten, dass diese Neurone für den anorektischen Effekt von Leptin zuständig seien. Im ArcL wirkt Leptin direkt auf POMC-Neurone, die das anorektische Peptid α -MSH produzieren (Cowley et al., 2001) und führt zu einer Aktivierung derselben. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit Studien, welche die mengenmässige Verteilung des Leptinrezeptors im Gehirn belegen. *Mercer et al. (1996)* zeigten nämlich, dass das Vorkommen von Leptin-Rezeptor mRNA im Hypothalamus am grössten ist.

8. Literaturverzeichnis

Alvarez, E.; Roncero, I.; Chowen, J.A.; Thorens, B.; Blazquez, E.

Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain

J. Neurochem. 66: 920-927, 1996

Arvat, E.; Maccario, M.; di Vito, L.; Broglio, F.; Benso, A.; Gottero, C.; Papotti, M.; Muccioli, G.; Camanni, F.; Ghigo, E.

Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: Comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone

J.Clin. Endocrinol. Metab. 86: 1169-1174, 2001

Asakawa, A.; Inui, A.; Kaga, T.; Yuzuriha, H.; Nagata, T.; Ueno, N.; Makino, S.; Fujimiya, M.; Niiijima, A.; Fujino, M.A.; Kasuga, M.

Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin

Gastroenterol. 120: 337-345, 2001

Bado, A.; Levasseur, S.; Attoub, S.; Kermorgant, S.; Laigneau, J.-P.; Bortoluzzi, M.-N.; Moizo, L.; Lehy, T.; Guerre-Millo, M.; Le Marchand-Brustel, Y.; Lewin, M.J.M.

The stomach is a source of leptin

Nature 394: 790-793, 1998

Bagnasco, M.; Kalra, P.S.; Kalra, S.P.

Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats

Endocrinol. 143: 726-729, 2002

Bell, G.I.; Sanchez-Pescador, R.; Laybourne P.J.; Najarian R.C.

Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene

Nature 304: 368-371, 1983a

Bell, G.I.; Santerre R.F.; Mullenbach, G.T.

Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides

Nature 302: 716-718, 1983b

Bowers, C.Y.

Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin

J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 1464-1469, 2001

Bowers, C.Y.; Momany, F.; Reynolds, G.A.; Chang, D.; Hong, A.; Chang, K.

Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro

Endocrinol. 106: 663-667, 1980

Broberger, C.; Landry, M.; Wong, H.; Walsh, J.N.; Hokfelt, T.

Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in proopiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus

Neuroendocrinol. 66: 393-408, 1997

Broglia, F.; Arvat, E.; Benso, A.; Gottero, C.; Muccioli G.; Papotti, M.; Van der Lely A.J.; Deghenghi, R.; Ghigo, E.

Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans

J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 5083-5086, 2001

Cinti, S., De Matteis, R.; Pico, C.; Ceresi, E.; Obrador, A.; Maffei, C., Oliver, J.; Palou, A.

Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin

Int. J. Obesity 24: 789-793, 2000

Considine, R.V.; Sinha, M.K.; Heiman, M.L.; Kriauciunas, A.; Stephens, T.W.; Nyce, M.R.; Ohannesian, J.P.; Marco, C.C.; McKee, L.J.; Bauer, T.L.; Caro, J.F.

Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans

N. Engl. J. Med. 334: 292-295, 1996

Cowley, M.A.; Smart, J.L.; Rubinstein, M.; Cerdan, M.G.; Diano, S.; Horvath, T.; Cone, R.D.; Low, M.J.

Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus

Nature 411: 480-484, 2001

Date, Y.; Kojima, M.; Hosoda, H.; Sawaguchi, A.; Mondal, M.S.; Suganuma, T.; Matsukura, S.; Kangawa, K.; Nakazato, M.

Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tract of rats and humans

Endocrinol. 141: 4255-4261, 2000

Date, Y.; Murakami, N.; Kojima, M.; Kuroiwa, T.; Matsukura, S.; Kangawa, K.; Nakazato, M.

Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats

Biochem. Biophys. Res. Comm. 275: 477-480, 2000

Date, Y.; Murakami, N.; Toshinai, K.; Matsukura, S.; Nijima, A.; Matsuo, H.; Kangawa, K.; Nakazato, M.

The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats

Gastroenterol. 123: 1120-1128, 2002

Date, Y.; Nakazato, M.; Murakami, N.; Kojima, M.; Kangawa, K.; Matsukura, S.

Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion

Biochem. Biophys. Res. Comm. 280: 904-907, 2001

Edwards, C.M.B.; Stanley, S.A.; Davis, R.; Brynes, A.E.; Frost, G.S.; Seal, L.J.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R.

Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers

Am. J. Physiol. 281: E155-E161, 2001

Egan, J.M.; Clocquet, A.R.; Elahi, D.

The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: Comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes

J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 1282-1290, 2002

Eissele, R.; Göke, R.; Willemer, S.; Harthus, H.-P.; Vermeer, H.; Arnold, R.; Göke, B.

Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man

Eur. J. Clin. Invest. 22: 283-291, 1992

Eng, J.; Kleinman, W.A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufman, J.P.

Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas

J. Biol. Chem. 267: 7402-7405, 1992

Flint, A.; Raben, A.; Ersboll, A.K.; Holst, J.J.; Astrup, A.

The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity

Int. J. Obesity 25: 781-792, 2001

Fukagawa, K.; Sakata, T.; Shiraishi, T.; Yoshimatsu, H.; Fujimoto, K.; Ookuma, K.; Wada, H.

Neuronal histamine modulates feeding behavior through H1-receptor in rat hypothalamus

Am. J. Physiol. 256: R605-11; 1989

Giralt, M.; Vergara, P.

Sympathetic pathways mediate GLP-1 actions in the gastrointestinal tract of the rat

Regul. Pept. 74: 19-25, 1998

Göke, R.; Fehmann, H-C.; Linn, T.; Schmidt, H.; Krause, M.; Eng, J.; Göke, B.

Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting β -cells

J. Biol. Chem. 268: 19650-19655, 1993

Göke, R.; Larsen, P.J.; Mikkelsen, J.D.; Sheikh, S.P.

Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites

Eur. J. Neurosci. 7: 2294-2300, 1995

Guan, X.-M.; Hess, J.F.; Yu, H.; Hey, P.J.; van der Ploeg, L.H.T.

Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain

Mol. Cell. Endocrinol. 133: 1-7, 1997

Guan, X.-M.; Yu, H.; Palyha, O.C.; McKee, K.K.; Feighner, S.D.; Sirinathsinghji, D.J.S.; Smith, R.G.; Van der Ploeg, L.H.T.; Howard, A.D.

Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues

Mol. Brain. Res. 48: 23-29, 1997

Halaas, J.L.; Gajiwala, K.S.; Maffei, M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; Rabinowitz, D.; Lallone, R.L.; Burley, S.K.; Friedman, J.M.

Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene

Science 269: 543-546, 1995

Hewson, A.K.; Dickson, S.L.

Systemic administration of ghrelin induces fos and egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats

J.Neuroendocrinol. 12: 1047-1049, 2000

Holst J.J.; Orskov, C.; Nielsen, O.V.; Schwartz T.W.

Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut

FEBS 211: 169-174, 1987

Holz, G.G.; Kühtreiber, W.M.; Habener J.F.

Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37)

Nature 361: 362-365, 1993

Horvath, T.L.; Diano, S.; Sotonyi, P.; Heiman, M.; Tschöp, M.

Ghrelin and the regulation of energy balance – a hypothalamic perspective

Endocrinol. 142: 4163-4169, 2001

Imeryüz, N.; Yegen, B.Ç.; Bozkurt, A.; Coskun, T.; Villanueva-Penacarrillo, M.L.; Ulusoy, N.B.

Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms

Am. J. Physiol. 273: G920-G927, 1997

Inoue, K.; Hisatomi, A.; Umeda, F.; Nawata, H.

Effects of glucagon-like peptide 1 (7-36) amide and glucagon on amylin release from perfused rat pancreas

Horm. Metabol. Res. 23: 407-409, 1991

Inui, A.

Ghrelin an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach

Nature 2: 1-10, 2001

Kalra S.P.; Dube, M.G.; Pu, S.; Xu, B.; Horvath, T.L.; Kalra, P.S.

Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight

Endocrine Rev. 20: 68-100, 1999

Kamegai, J.; Tamura H.; Shimizu, T.; Ishii, S.; Sugihara H.; Wakabayashi I.

Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression

Endocrinol. 141: 4797-4800, 2000

Kanse, S.M.; Kreymann, B.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R.

Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 7-36 amide-binding sites in the rat brain and lung

FEBS 241: 209-212, 1988

Kennedy, GC.

The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat

Proc. Royal Soc. Lond. B. Biol. Soc. 140: 578-592, 1953

Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K.

Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach

Nature 402: 656-660, 1999

Kojima, M.; Hosoda, H.; Matsuo, H.; Kangawa, K.

Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor

Trends Endocrinol. Metab. 12: 118-122, 2001

Larsen, P.J.; Fledelius, C.; Knudsen, L.B.; Tang-Christensen, M.

Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats

Diabetes 50: 2530-2539, 2001

Larsen, P.J.; Tang-Christensen, M.; Holst, J.J.; Orskov, C.

Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem

Neuroscience 77: 257-270; 1997a

Larsen, P.J.; Tang-Christensen, M.; Jessop, D.S.

Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat

Endocrinol. 138: 4445-4455, 1997b

Lawrence C.B.; Snape A.C.; Baudoin F.M.-H.; Luckman, S.M.

Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers

Endocrinol. 143: 155-162, 2002

Lin, J.; Barb, C.R.; Matteri, R.L.; Kraeling, R.R.; Chen, X.; Meinersmann, R.J.; Rampacek G.B.

Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig

Dom. Animal Endocrinol. 19: 53-61, 2000

Lu, M.; Weehler, M.B.; Leng, X.-H.; Boyd, A.E.

The role of the free cytosolic calcium level in β -cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1 (7-37)

Endocrinol. 132: 94-100, 1993

Lutz, T.A.; Althaus, J.; Rossi, R.; Scharrer, E.

Anorectic effect of amylin is not transmitted by capsaicin-sensitive nerve fibers

Am. J. Physiol. 274: R1777-R1782, 1998a

Lutz, T.A.; Bloch-Thomsen, A.; Tang-Christensen, M; Mollet, A.; Zünd, D.; Riediger, T.

Amylin activates hindbrain neurons in areas expressing glucagon-like peptide 1

Proc. Soc. Study Ing. Behav. (Annual Meeting Santa Cruz), 2002

Lutz, T.A.; Del Prete, E.; Scharrer, E.

Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin

Physiol. Behav. 55: 891-895, 1994

Lutz, T.A.; Del Prete, E.; Scharrer, E.

Subdiaphragmatic vagotomy does not influence the anorectic effect of amylin

Peptides 16: 457-462, 1995

Lutz, T.A.; Senn, M.; Althaus, J.; Del Prete, E.; Ehrensperger, F.; Scharrer, E.

Lesion of the area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats

Peptides 19: 309-317, 1998b

Masuda, Y.; Tanaka, T.; Inomata, N.; Ohnuma, N.; Tanaka, S.; Itoh, Z.; Hosoda, H.; Kojima, M.; Kangawa, K.;

Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats

Biochem. Biophys. Res. Comm. 276: 905-908, 2000

Masuzaki, H.; Ogawa, Y.; Isse, N.; Satoh, N.; Okazaki, T.; Shigemoto, M.; Mori, K.; Tamura, N.; Hosoda, K.; Yoshimasa and al. et

Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue

Diabetes 44: 7855-7858, 1995

Masuzaki, H.; Ogawa, Y.; Sagawa, N.; Hosoda, K.; Matsumoto, T.; Mise, H.; Nishimura, H.; Yoshimasa, Y.; Tanaka, I.; Mori, T.; Nakao, K.

Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans

Nature 3: 1029-1033, 1997

McIntyre, M.; Holdsworth, CD.; Turner DS.

New interpretation of oral glucose tolerance

Lancet II: 20-21, 1964

McMahon, L.R.; Wellman, P.J.

PVN infusion of GLP-1(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats

Am. J. Physiol. 274: R23-R29, 1998

Meeran, K.; O'Shea, D.; Edwards, C.M.B.; Turton, M.D.; Heath, M.M.; Gunn, I.; Abusnana, S.; Rossi, M.; Small, C.J.; Goldstone, A.P.; Taylor, G.M.; Sunter, D.; Steere, J.; Choi, S.J.; Ghatel, M.A.; Bloom, S.R.

Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat

Endocrinol. 140: 244-250, 1999

Mercer, J.G.; Hoggard, N.; Williams, L.M.; Lawrence, C.B.; Hannah, L.T.; Trayhurn, P.

Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization

FEBS 387: 113-116, 1996

Mercer, J.G.; Moar, K.M.; Findlay, P.A.; Hoggard, N.; Adam C.L.

Association of leptin receptor (OB-Rb), NPY and GLP-1 gene expression in the ovine and murine brainstem

Regul. Pept. 75-76: 271-278, 1998

Mercer, L.P.; Kelley, D.S.; Humphries, L.L.; Dunn, J.D.

Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats

Nutrition 124: 1029-1036, 1994

Meyer, C.; Robson, D.; Rackovsky, N.; Nadkarni, V.; Gerich, J.

Role of the kidney in human leptin metabolism

Am. J. Physiol. 273: E903-E907, 1997

Mojsov, S.; Weir, G.C.; Habener, J.F.

Insulinotropin: Glucagon-like peptide 1 (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas

J. Clin. Invest. 79: 616-619, 1987

Mollet, A.; Lutz, T.A.; Meier, S.; Riediger, T.; Rushing, P.A.; Scharrer, E.

Histamine H1 receptors mediate the anorectic action of the pancreatic hormone amylin

Am. J. Physiol. 281: R1442-1448, 2001

Montrose-Rafizadeh, C.; Egan, J.M.; Roth, J.

Incretin hormones regulate glucose-dependent insulin secretion in RIN 1064-38 cells: Mechanisms of action

Endocrinol. 135: 589-593, 1994

Nachman, M.; Ashe, J.H.

Learned taste aversions in rats as a function of dosage, concentration and route of administration of LiCl

Physiol. Behav. 10: 73-78, 1973

Nakazato, M.; Murakami, N.; Date, Y.; Kojima, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K.; Matsukura, S.

A role for ghrelin in the central regulation of feeding

Nature 409: 194-198, 2001

Nauck, M.A.

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective

Acta Diabetol. 35:117-129, 1998

Näslund, E.; Bogefors, J.; Skogar, S.; Grybäck, P.; Jacobsson, H.; Holst J.J.; Hellström, P.M.

GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon and PYY release in humans

Am. J. Physiol. 277: R910-R916, 1999

Orskov, C.; Bersani, M.; Johnsen, A.H.; Hojrup, P.; Holst, J.J.

Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine

J. Biol. Chem. 264:12826-12829, 1989

Orskov, C.; Holst, J.J.; Knuhtsen, S.; Baldissera, F. G.A.; Poulsen, S.S.; Nielsen, O.V.

Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas

Endocrinol. 119: 1467-1475, 1986

Orskov, C.; Holst, J.J.; Nielsen O.V.

Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach

Endocrinol. 123: 2009-2013, 1988

Parkes, D.; Jodka, C.; Smith, P.; Nayak, S.; Rinehart, L.; Gingerich, R.; Chen, K.; Young, A.

Pharmacokinetic actions of exendin-4 in the rat: Comparison with glucagon-like peptide-1

Drug Dev. Res. 53: 260-267, 2001

Parkes, D.; Pittner, R.; Jodka, C.; Smith, P.; Young, A.

Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro
Metabolism 50: 583-589, 2001

Pelleymounter, M.A.; Cullen, M.J.; Baker, M.B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F.

Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice
Science 269: 540-543, 1995

Perfetti, R.; Merkel, P.

Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic β -cell function
Eur. J. Endocrinol. 143: 717-725, 2000

Riediger, T.; Traebert, M.; Schmid, H.A.; Scheel, C.; Lutz, T.A.; Scharrer, E.

Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus
Im Druck

Rinaman, L.

A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia
Am. J. Physiol. 277: R1537-R1540, 1999

Rowland, N.E.; Crews, E.C.; Gentry, R.M.

Comparison of Fos induced in rat brain by GLP-1 and amylin
Regul. Pept. 71:171-174, 1997

Sakata, T.; Yoshimatsu, H.; Kurokawa, M.

Hypothalamic neuronal histamine: implications of its homeostatic control of energy metabolism

Nutrition. 13: 403-411, 1997

Seoane, L.M.; Tovar, S.; Baldelli, R.; Arvat, E.; Ghigo, E.; Casanueva, F.F.; Dieguez, C.

Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats

Eur. J. Endocrinol. 143: R7-R9, 2000

Shiia, T.; Nakazato, M.; Mizuta, M.; Date, Y.; Mondal, MS.; Tanaka, M.; Nozoe, S.; Hosoda, H.; Kangawa, K.; Matsukura, S.

Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion

J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 240-244, 2002

Shintani, M.; Ogawa, Y.; Ebihara, K.; Aizawa-Abe, M.; Miyanaga, F.; Takaya K.; Hayashi T.; Inoue G.; Hosoda K.; Kojima M.; Kangawa K.; Nakao K.

Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway

Diabetes 50: 227-232, 2001

Shughrue, P.J.; Lane, M.V.; Merchenthaler, I.

Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) mRNA in the rat hypothalamus

Endocrinol. 137: 5159-5162, 1996

Smith, R.G.; Feighner, S.; Prendergast, K.; Guan, X.; Howard, A.

A new orphan receptor involved in pulsatile growth hormone release

Trends Endocrinol. Metab. 10: 128-135, 1999

Szabady, M.;

Zur Regulation der Futteraufnahme durch Amylin

Inaugural-Dissertation, Universität Zürich, 1995

Szayna, M.; Doyle, M.E.; Betkey, J.A.; Holloway, H.W.; Spencer, R.G.S.; Greig, N.H.; Egan, J.M.

Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats
Endocrinol. 141: 1936-1941, 2000

Takaya, K.; Ariyasu, H.; Kanamoto, N.; Iwakura, H.; Yoshimoto, A.; Harada, M.; Mori, K.; Komatsu, Y.; Usui, T.; Shimatsu, A.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Akamizu, T.; Kojima, M.; Kangawa, K.; Nakao, K.

Ghrelin strongly stimulates growth hormone (GH) release in humans
J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 4908-4911, 2000

Tang-Christensen, M.; Larsen, P.J.; Göke, R.; Fink-Jensen, A.; Jessop, D.S.; Moller, M.; Sheikh, S.P.

Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats
Am. J. Physiol. 271: R848-R856, 1996

Tang-Christensen, M.; Vrang, N.; Larsen, P.J.

Glucagon-like peptide 1(7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment
Diabetes 47: 530-537, 1998

Thiele, T.E.; van Dijk, G.; Campfield, L.A.; Smith, F.J.; Burn, P.; Woods, S.C.; Bernstein, I.L.; Seeley, R.J.

Central infusion of GLP-1, but not leptin, produces conditioned taste aversions in rats
Am. J. Physiol. 272: R726-R730, 1997

Thorens, B.; Porret, A.; Buhler, L.; Deng, SP.; Morel, P.; Widman, C.

Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor
Diabetes 42: 1678-1682, 1993

Tolessa, T.; Gutniak, M.; Holst J.J.; Efendic, S.; Hellström, P.M.

Inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 on small bowel motility

J. Clin. Invest. 102: 764-774, 1998

Toshinai, K.; Mondal, M.S.; Nakazato, M.; Date, Y.; Murakami, N.; Kojima, M.; Kangawa, K.; Matsukura, S.

Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration

Biochem. Biophys. Res. Comm. 281: 1220-1225, 2001

Traebert, M.; Riediger, T.; Whitebread, S.; Scharrer, E.; Schmid, H.A.

Ghrelin acts on leptin-responsive neurons in the rat arcuate nucleus

J. Neuroendocrinol. 14: 580-586, 2002

Trayhurn, P.; Hoggard, N.; Mercer, J.G.; Rayner, D.V.

Leptin; fundamental aspects

Int. J. Obesity 23: 22-28, 1999

Tschöp, M.; Smiley, D.L.; Heiman, M.L.

Ghrelin induces adiposity in rodents

Nature, 407: 908-913, 2000

Tschöp, M.; Statnick, M.A.; Suter, T.D.; Heiman, M.L.

GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein

Endocrinol. 143: 558-568, 2002

Turton, M.D.; O'Shea, D.; Gunn, I.; Beak, S.A.; Edwards, C.M.B.; Meeran, K.; Choi, S.J.; Taylor, G.M.; Heath, M.M.; Lambert, P.D.; Wilding, J.P.H.; Smith, D.M.; Ghatei, M.A.; Herbert, J.; Bloom, S.R.

A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding

Nature 379: 69-72, 1996

van Dijk, G.; Thiele, T.E.

Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide: a central regulator of satiety and interoceptive stress

Neuropeptides 33: 406-414, 1999

van Dijk, G.; Thiele, T.E.; Seeley, R.J.; Woods, S.C.; Bernstein, I.L.

Glucagon-like peptide-1 and satiety

Nature 385: 214, 1997

Wang, T.; Edwards, G.L.; Baile, C.A.

Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide administered into the third cerebroventricle inhibits water intake in rats

Exp. Biol. Med. 219: 85-91, 1998

Wang, Y.; Egan, J.M.; Raygada, M.; Nadiv, O.; Roth, J.; Montrose-Rafizadeh, C.

Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-38 cells

Endocrinol. 136: 4910-4917, 1995

Wang, Y.; Perfetti, R.; Greig, N.H.; Holloway, H.W.; DeOre, K.A.; Montrose-Rafizadeh, C.; Elahi, D.; Egan, J.M.

Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats

J. Clin. Invest. 99: 2883-2889, 1997

Weigle, D.S.; Bukowski, T.R.; Foster, D.C.; Holderman, S.; Kramer, J.M.; Lasser, G.; Lofton-Day, C.E.; Prunkard, D.E.; Raymond, C.; Kuijper, J.L.

Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse

J. Clin. Invest. 96: 2065-2070, 1995

Wettergren, A.; Wojdemann, M.; Holst J.J.;

Glucagon-like peptide-1 inhibits gastropancreatic function by inhibiting central parasympatic outflow

Am. J. Physiol. 275: G984-G992, 1998

Willesen, M.G.; Kristensen, P.; Romer, J.

Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat

Neuroendocrinol. 70: 306-316, 1999

Wren , A.M.; Small, C.J.; Abbott, C.R.; Dhillon, W.S.; Seal, L.J.; Cohen M.A.; Batterham, R.L.; Taheri, S.; Stanley, S.A.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R.

Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats

Diabetes 50: 2540-2547, 2001

Wren, A.M.; Small, C.J.; Ward, H.L.; Murphy, K.G.; Dakin, C.L.; Taheri, S.; Kennedy, A.R.; Roberts, G.H.; Morgan, D.G.A.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R.

The novel hypothalamic peptide Ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion

Endocrinol. 141: 4325-4328, 2000

Xu, G.; Stoffers, D.A.; Habener, J.F.; Bonner-Weir, S.

Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats

Diabetes 48: 2270-2276, 1999

Yokote, R.; Sato, M.; Matsubara, S.; Ohye, H.; Niimi, M.; Murao, K.; Takahara J.

Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues

Peptides 19: 15-50, 1998

Young, A.A.; Gedulin, B.R.; Bhavsar, S.; Bodkin, N.; Jodka, C.; Hansen, B.; Denaro, M.

Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4

Diabetes 48: 1026-1034, 1999

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M.

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue

Nature 372: 425-431, 1994

9. Danksagung

Mein Dank geht an alle, die mich in irgendeiner Form unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Speziell danken möchte ich:

allen **Mitarbeiter/innen** und **Doktorand/innen** des Institutes für Veterinärphysiologie für das gute Arbeitsklima, insbesondere:

Herrn PD Dr. T. A. Lutz für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referats, sowie für die Durchführung der AP-Läsionen und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Ebenfalls bedanken möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die hervorragende Betreuung und Beratung beim Verfassen dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. C. Reusch für die Übernahme des Korreferats

Herrn Prof. Dr. E. Scharrer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Durchsicht des Manuskripts.

Frau Dr. E. Del Prete für ihre freundliche und hilfsbereite Art, ihr Engagement für die Versuchstiere und ihre jederzeit gewährte Mithilfe bei der Betreuung derselben.

Frau E. Nietlispach und **Frau G. Eger** für die jederzeit gewährte, freundliche und kompetente Hilfe in administrativen Belangen.

Allen **Doktorandinnen**, die während dieser Zeit das Büro mit mir geteilt und für eine humorvolle Stimmung und kulinarische Abwechslung gesorgt haben. Ein spezielles Dankeschön geht an **Andrea** und **Valérie** für die grosszügige Mithilfe bei der Durchführung der Experimente, sowie an **Daniela** für das „Hüten“ der Ratten.

Der stellvertretenden Tierpflegerin **Marychelo Rios**, die sich mit grossem Einsatz und Ideenreichtum um das Wohl unserer Versuchstiere gekümmert hat.

Und schliesslich den **Ratten** für ihre Kooperation

Ein grosses Dankeschön geht auch an meine Tante **Rita** für all die witzigen E-mails und ihre grosszügige Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich **meinen Eltern**, die immer für mich da waren und mich auf meinem Weg in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben.